



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Kürbispollen als Nahrung für *Heliconius*-Falter

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Doris Katharina Aichinger
Matrikel-Nummer:	9706754
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 190 445 299
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Harald Krenn

Wien, im Juni 2010



# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1. EINLEITUNG</u></b> .....	1
<b><u>2. MATERIAL UND METHODE</u></b> .....	7
2.1 Material.....	7
2.1.1 Pollenkörner von <i>Cucurbita pepo</i> .....	7
2.1.2 Versuchstiere der Art <i>Heliconius melpomene</i> , Haltungs- und Zuchtbedingungen.....	10
2.2 Methode .....	12
2.2.1 Beschaffung der frischen Kürbispollen .....	12
2.2.2 Durchführung der Versuche .....	14
<b><u>3. ERGEBNISSE</u></b> .....	19
3.1 Zustand der Pollenkörner in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen .....	19
3.2 Vergleich der Pollenpräparate.....	27
<b><u>4. DISKUSSION</u></b> .....	32
4.1 Versuche mit den Schmetterlingen (Versuchsbedingung 1).....	32
4.2 Versuche mit den Flüssigkeiten (Versuchsbedingungen 2-7) .....	34
4.2.1 Glycerinkontrollgruppe .....	34
4.2.2 Versuche mit Wasser, Nektar und Protease.....	35
4.3 Mögliche Einflussfaktoren auf den Extraktionsprozess der Nährstoffe aus den Pollenkörnern .....	37
<b><u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	41
<b><u>6. ABSTRACT</u></b> .....	43
<b><u>7. LITERATURVERZEICHNIS</u></b> .....	45
<b><u>8. ANHANG</u></b> .....	48
<b><u>9. DANKSAGUNG</u></b> .....	61
<b><u>10. LEBENSLAUF</u></b> .....	62



## 1. Einleitung

Die Arten der neotropischen Tagfalter-Gattung *Heliconius* zeigen ein unter Schmetterlingen einzigartiges und in einigen Details bereits gut untersuchtes Verhalten der Nahrungsaufnahme, das sie sonst nur mit der phylogenetisch nahestehenden Art *Laparus doris* teilen. Nach Brown (1981) sind 38 *Heliconius*-Arten bekannt. Die wichtigste Nahrungsquelle der meisten Schmetterlinge ist Blütennektar, manche nutzen auch Pflanzensäfte, etwa solche von Früchten oder Bäumen (Krenn, 2008). *Heliconius*-Schmetterlinge sind jedoch in der Lage, durch eine spezielle Bearbeitungstechnik auch Pollenkörner aus den Antheren verschiedener Pflanzen zu sammeln und als Nahrung zu verwerten (Gilbert, 1972).



**Abb. 1: *Heliconius*-Falter mit Pollenladung auf dem Proboscis. Foto: Dr. Harald Krenn**

Dadurch kommt diesen *Heliconius*-Arten eine Sonderstellung unter den Schmetterlingen zu. Die Imagines der pollenfressenden *Heliconius*-Falter zeigen ein komplexes und faszinierendes Verhalten, um für sie essentielle Nährstoffe aus den Pollenkörnern zu gewinnen. Mit der Spitze des Saugrüssels entnehmen sie durch mehrmalige ruckartig-schabende Bewegungen Pollenkörner von den Antheren der Blüten, formen diese zu einem am Saugrüssel klebenden Klumpen und kneten dieses Pollenpaket unter Zugabe klarer Flüssigkeit aus der Spitze des Proboscis durch stundenlanges Aus- und Einrollen des Saugrüssels (Gilbert, 1972). Die Flüssigkeit wird nach der Pollenbearbeitung mit dem Polleninhalte über die Proboscisspitze aufgenommen. Die Pollenkörner selbst können durch den schmalen Proboscis nicht ingestiert werden und werden abgeworfen. Es konnte gezeigt werden, dass Speichel für die Pollenbearbeitung verwendet wird (Eberhard et al., 2009 a) und die Pollenkörner bei dieser Bearbeitung zerstört werden (Krenn et al., 2009). Das Foto in Abbildung 1 zeigt einen *Heliconius*-Schmetterling mit einem Pollenpaket auf dem Saugrüssel.

Zu den natürlichen Pollenquellen der pollenfressenden *Heliconius*-Falter zählen neben manchen Rubiaceae, Boraginaceae und Polygalaceae auch Vertreter der Cucurbitaceae-Gattungen *Psiguria* (*Anguria*) und *Gurania* (Gilbert, 1991). Pollenkörner sind reich an Proteinen, Aminosäuren, Stickstoff, Lipiden, Stärke und Sterolen (Roulston und Cane, 2000). Der Gehalt an Proteinen schwankt zwischen 2-60 % (Roulston und Cane, 2002). Geklärt ist, dass die Falter durch die Pollenbearbeitung essentielle Aminosäuren aus Proteinen und somit in den Aminosäuren enthaltene Stickstoffmoleküle aus den Pollenkörnern extrahieren (Gilbert, 1972). Das Pollenbearbeitungsverhalten und die damit verbundene Stickstoffaufnahme ermöglichen Faltern der Gattung *Heliconius* einige Vorteile und haben großen Einfluss auf ihre Lebensweise (Brown, 1981; Gilbert, 1991). Die meisten Schmetterlinge leben im Normalfall wenige Wochen, in denen sie sich nur begrenzt fortpflanzen können. Bei den pollenfressenden Heliconiinae jedoch berichtet Gilbert (1972) sowohl unter Freiland- als auch Laborbedingungen von einer ungewöhnlich hohen Lebenserwartung von sechs Monaten und mehr. Es sollen bereits Individuen bis zu neun Monate gelebt haben (Murawski, 1993)- wahre Methusalems unter den Schmetterlingen also. Ohne die Pollennahrung verkürzt sich ihre Lebensdauer entscheidend (Boggs et al., 1981). Wegen der Eiablage und Larvenentwicklung auf Passionsblumen (Passifloraceae) ist auch der Trivialname Passionsblumenfalter gebräuchlich. Die Passionsblumen produzieren Giftstoffe gegen Fressfeinde, doch die Raupen der *Heliconius*-Falter sind immun gegen das Gift (Murawski, 1993). Das Larvenstadium ist bei *Heliconius*-Arten im Vergleich zu anderen Schmetterlingen sehr kurz (Gilbert, 1991; Murawski, 1993). Obgleich die Raupen der Heliconiinae ausschließlich an den giftigen Passionsblumen fressen, deren Gift aufnehmen und dementsprechend Schutz durch ihre Ungenießbarkeit erhalten, wird die beschleunigte Entwicklung der Larven als Anpassung einerseits an den sehr hohen Räuberdruck durch Parasiten und invertebrate Räuber in diesem Lebensstadium und die somit höhere Vulnerabilität der Larven in Relation zu den mobileren Imagines (Gilbert, 1991) und andererseits an das Pollenfressen der Imagines (Murawski, 1993) gewertet. Es wird vermutet, dass die *Heliconius*-Falter neben der Aufnahme von Cyaniden aus den Passionsblumen als Raupen auch die Fähigkeit haben, aus den aus Pollenkörnern aufgenommenen Aminosäuren zusätzliche Cyanglucoside zu synthetisieren und dies die Imagines für Fressfeinde ungenießbar macht (Murawski, 1993; Gilbert, 1991). Auch für die Evolution der beobachtbaren ausgeprägten Warnfärbungen könnte die Synthese dieser Cyanverbindungen entscheidend sein. In diesem Zusammenhang sei auch das für die Heliconiinae typische Phänomen der Müllerschen Mimikry, also die Ausbildung von sich auffallend ähnelnden

Farbzeichnungen bei ungenießbaren oder giftigen Arten zum Zwecke der Räuberabwehr, erwähnt (Murawski, 1993). Weiters zeigen die *Heliconius*-Falter eine ihr gesamtes Leben umfassende kontinuierliche Reproduktionsfähigkeit und Eiablage, wobei die Weibchen, wohl des höheren Energiebedarfs wegen, größere Pollenmengen sammeln (Gilbert, 1972; Boggs et al., 1981). Während der für die Produktion von Eiern benötigte Stickstoff bei anderen Schmetterlingen aus den begrenzten Reserven im Fettkörper, die im Larvenstadium gebildet werden, stammt, können sich die Heliconiinae durch die Pollennahrung kontinuierlich mit Stickstoff versorgen und lebenslang Eier produzieren (Gilbert, 1972). Die aus dem Pollen gewonnenen Aminosäuren werden, wie nachgewiesen werden konnte, in die Eier eingebaut (O'Brien et al., 2003). Die kontinuierliche Eiablage in kleinen Mengen ermöglicht eine größere Dispersion des Nachwuchses, was ebenso einen Schutz gegen Parasiten und Fressfeinde darstellt (Gilbert, 1972). Weiters haben *Heliconius*-Falter relativ große Gehirne für Schmetterlinge und zeichnen sich durch beeindruckende Gedächtnisleistungen aus (Murawski, 1993). Der Vollständigkeit wegen sei auch das interessante Phänomen des „pupal mating“ erwähnt, also der Paarung von Männchen mit gerade schlüpfenden Weibchen als Folge von geringen Populationsdichten (Gilbert, 1991). Auch für diese Besonderheiten wird die Ursache in der hochwertigen Pollennahrung gesehen.

Das Tragen von Pollenkörnern wird auch bei anderen Schmetterlingen beobachtet (Penz und Krenn, 2000). Zu Beginn der Forschung über *Heliconius*-Falter gab es Zweifel darüber, ob die *Heliconius*-Schmetterlinge den Pollen tatsächlich gezielt aktiv sammeln. Eine gegenteilige Hypothese besagte, dass sie Pollenkörner unbeabsichtigt im Zuge der Nektarsammeltätigkeit aus den Blüten entfernen würden. Gilbert (1972) führt jedoch mehrere schlüssige Befunde an, die zeigen, dass eine gezielte Pollenaufnahme stattfindet. Nicht zuletzt konnten in neueren Untersuchungen bei pollenfressenden Schmetterlingen neben einem speziellen Verhaltensmuster beim Blütenbesuch, etwa einer im Durchschnitt geringeren Blütenbesuchsrate pro Sekunde (Krenn, 2008), auch morphologische Besonderheiten (zahlreichere und längere Sensillen in der mittleren und proximalen Region und kürzere Sensillen an der Spitze des Proboscis sowie kürzere Labialpalpen) bei den Mundwerkzeugen der pollenfressenden *Heliconius*-Falter festgestellt werden, die in Zusammenhang mit der Aufnahme von Pollennahrung gesehen werden (Krenn und Penz, 1998).

Eine Forschungsfrage beschäftigt sich damit, wie genau die Schmetterlinge an den für sie essentiellen Inhalt der Pollenkörner gelangen. Bereits in früheren Arbeiten zur

Ernährungsweise der pollenfressenden Heliconiinae konnte beobachtet werden, dass während der Pollenbearbeitung die Pollenmasse mit einer klaren, aus der Spitze des Proboscis abgesonderten Flüssigkeit befeuchtet wird. Aus der Proboscisspitze abgegebene Flüssigkeit wird von anderen Nymphaliden zum Verflüssigen von Nahrungsmitteln, etwa getrocknetem Zucker, eingesetzt (Knopp und Krenn, 2003). In einer Untersuchung wurde von pollenfressenden *Heliconius*-Faltern und *Laparus doris* jedoch besonders viel Flüssigkeit abgesondert (Penz und Krenn, 2000). Diese Flüssigkeit wird von Penz und Krenn (2000) als wesentlich für die ausreichende Haftung der Pollenkörner am Proboscis angesehen. Dies könnte aber nicht der einzige Nutzen für die pollenfressenden *Heliconius*-Schmetterlinge sein.

Es wurde lange angenommen, dass es sich bei dieser Flüssigkeit um von den Tieren wieder hervorgewürgten Blütennektar handeln würde (Gilbert, 1972). Wegweisend für die Lehrmeinung darüber, dass hervorgewürgter Nektar beim Pollenbearbeitungsverhalten der *Heliconius*-Falter involviert ist, waren frühere Versuche. Gilbert (1972) zitiert Experimente, in denen gezeigt wurde, dass manche lebenden Pollenkörner bei Inkubation in zehnpromzentiger Sucroslösung bei einer Temperatur von 25 °C bereits innerhalb einer Minute 50 Prozent der freien Aminosäuren und Proteine aktiv freisetzen und während der Keimung eine Synthese von Aminosäuren stattfindet. Weiters führt Gilbert (1972) an, dass keimender Pollen nach zweistündiger Inkubationszeit die Aminosäuren Arginin, Leucin, Lysin und Valin freisetzt. Gilbert zog aus dieser Eigenschaft der Pollenkörner den Schluss, dass die Schmetterlinge keine Ingestion und/ oder enzymatische Verdauung für die Entfernung und Aufnahme der Aminosäuren benötigen. In einem weiteren Experiment von Gilbert (1972) wurden *Heliconius*-Faltern feuchte Pollenladungen abgenommen, in fünfzehnprozentiger Sucrose-Lösung suspendiert, zentrifugiert und anschließend die Proteine im Überstand mittels Elektrophorese untersucht. Dabei wurden damals, laut Gilbert, nur Pollenenzyme und keine Enzyme des Darms der Schmetterlinge gefunden. Gesucht wurde sowohl in den Pollenproben als auch in Kropf- und Darminhalt der Schmetterlinge nach denselben Enzymen. Eberhard et al. (2007) kritisieren in ihrer Arbeit, dass Gilbert nicht in Erwägung zog, dass die gefundenen Enzyme statt aus dem Pollen auch aus Speichel stammen könnten. Im Zusammenhang mit dem Pollenbearbeitungsverhalten der *Heliconius*-Falter brachte die Forschung von O'Brien et al. (2003) die Erkenntnis, dass durch das Bearbeitungsverhalten der Falter die Abgabe der Aminosäuren in Relation zu bloßem Einlegen in destilliertem Wasser gesteigert ist. Dies wurde als Hinweis für die Hypothese angesehen, dass ein Bestandteil des Speichels von *Heliconius*-Faltern die Freisetzung der Nährstoffe fördern könnte (Eberhard et al., 2007).



Neuere Forschungsergebnisse sprechen gegen die Theorie, dass hervorgewürgter Nektar für die Pollenbearbeitung verwendet wird. Eine interessante Studie von Eberhard et al. (2009 a), unter anderem mit gefärbtem Nektar, bestätigte, dass es sich bei der abgegebenen Flüssigkeit nicht um Nektar oder ein Nektar-Speichelgemisch, sondern tatsächlich um Speichel handelt. Die Autoren führten Versuche durch, bei denen sie *Heliconius*-Falter mit gefärbtem Nektar fütterten, ihnen Pollen an den Proboscis hefteten und bei Beginn der Pollenbearbeitung die Farbe der dazu abgegebenen Flüssigkeit untersuchten. Diese war stets ungefärbt. Die Ausscheidungen der Tiere waren jedoch auch noch längere Zeit nach dem Experiment gefärbt, was die Autoren als Beleg dafür werten, dass der Farbstoff im Verdauungstrakt nicht einfach abgebaut und der Nektar farblos wieder hervorgewürgt wird. In einer zweiten Testreihe wurde die aus dem Proboscis abgegebene Flüssigkeit auf ihren Zuckergehalt hin untersucht. *Heliconius*-Falter wurden dazu über Nacht isoliert und morgens mit Wasser und dann einer Zuckerlösung gefüttert. Der Proboscis wurde mit destilliertem Wasser gespült und den Tieren Glasperlen als Pollenersatz angeheftet. Bei Start der Pollenbearbeitung und Abgabe von Flüssigkeit aus den Saugrüsseln wurden die Pollenpakete mit destilliertem Wasser abgespült und die Proben mittels Dünnschichtchromatographie auf ihren Zuckergehalt untersucht. Weder im Labor noch an Individuen aus dem Freiland konnte Zucker in der Flüssigkeit, mit welcher der Pollen bearbeitet wurde, nachgewiesen werden.

Erste Untersuchungen der Speicheldrüse konnten jedoch keine histologischen Unterschiede zwischen pollenfressenden und nicht pollenfressenden Schmetterlingen nachweisen (Eberhard und Krenn, 2003). Erst der morphometrische Vergleich der Proportionen der Speicheldrüsen zwischen verschiedenen Arten zeigte, dass die Drüsenregion bei den pollenfressenden Arten größer ist als bei verwandten Tagfaltern (Eberhard et al., 2009 b).

Eberhard et al. (2007) gelang der Nachweis einer Protease im Speichel. Bei dieser Studie wurden Glasperlen oder (frische oder tiefgekühlte) Pollenkörner auf die Saugrüssel aufgebracht. Wenn die Pollen- oder Glasperlenpakete von den Tieren mit einem Tropfen Speichel benetzt wurden, wurden diese mit destilliertem Wasser abgespült. Die Proben wurden mit einem Protein-Farbstoff-Komplex gemischt, der bei Anwesenheit einer Protease eine Farbreaktion bewirkt. In allen mit Speichel benetzten Proben wurde mit einem Spektralphotometer eine ähnlich hohe Proteasemenge nachgewiesen, wobei die Proben mit Kürbispollen und Speichel etwas mehr Protease enthielten als jene mit Glasperlen und Speichel. Es ist den Autoren nach nicht völlig auszuschließen, dass die Pollenkörner durch den Speichel stimuliert werden, Proteasen freizusetzen und dies den geringen Unterschied

erklärt. Als Kontrolle wurden deswegen auch Pollenkörner untersucht, die nicht mit Speichel in Kontakt kamen. Diese Proben zeigten eine geringe Proteasemenge im Pollen selbst und werden darum als wesentlicher Faktor für das Ergebnis ausgeschlossen. Als wahrscheinlichste Ursache für die Unterschiede zwischen dem Kürbispollen und den Glasperlen beschreiben die Autoren eine möglicherweise vermehrte Abgabe von Speichel und somit mehr Protease bei den Proben mit Pollenkörnern, weil die Tiere durch deren Geschmack dazu stimuliert werden könnten. Größere Pollenmengen könnten nach Eberhard et al. (2007) eine größere Speichelmenge oder –konzentration benötigen, um sie vollständig zu benetzen. Die Autoren schreiben, dass die Ergebnisse der Studie ihrer Ansicht nach darauf hindeuten, dass Proteasen im Speichel der Versuchstiere die Freisetzung von Aminosäuren aus Pollenkörnern steigern. Sie kommen zu dem Schluss, dass, falls bei nicht pollenfressenden, nah verwandten Heliconiinae keine Protease im Speichel gefunden werden könne, dies als ein neues Merkmal im Zusammenhang mit dem Pollenfressen entstanden sein könnte. Weiters wird hervorgehoben, dass es wichtig sei herauszufinden, welchen Veränderungen Pollenkörner bei der Pollenbearbeitung ausgesetzt werden.

### **Fragestellung und Zielsetzung der Diplomarbeit**

Der genaue Prozess der Pollenbearbeitung und der Extraktion der Nährstoffe, sowie die genaue Funktion der Protease bei dieser extraoralen Verdauung sind noch nicht detailliert erforscht. Eine aktuelle Publikation über die Untersuchung des Zustandes von Pollenproben von freilebenden Schmetterlingen in Costa Rica und einer Glashauspopulation in Texas hat gezeigt, dass die Pollenkörner bei der Pollenbearbeitung teilweise zerstört werden (Krenn et al., 2009). Das Kernthema, mit dem sich diese Diplomarbeit beschäftigt, ist die Durchführung von Versuchen, bei denen unter standardisierten Bedingungen der Einfluss verschiedener Probeflüssigkeiten (Wasser, Nektar, zwei Protease-Lösungen, Glycerin) auf den Zustand von frischen Pollenkörnern der Art *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) untersucht wird. Es soll, ausgehend von der Hypothese, dass Protease enthaltender Speichel wesentlich bei der Pollenbearbeitung ist, untersucht werden, welchen Einfluss eine Protease-Lösung auf die Pollenkörner hat und die Annahme überprüft werden, dass Nektar oder Wasser alleine zu keinen ähnlichen Veränderungen von Pollenkörnern wie beim Bearbeitungsverhalten führen. Die Versuche sollen Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Weise die Zugabe von Nektar, Wasser und Protease-Lösung zu Pollenproben die Form und den Zustand der Pollenkörner beeinträchtigt.

## **2. Material und Methode**

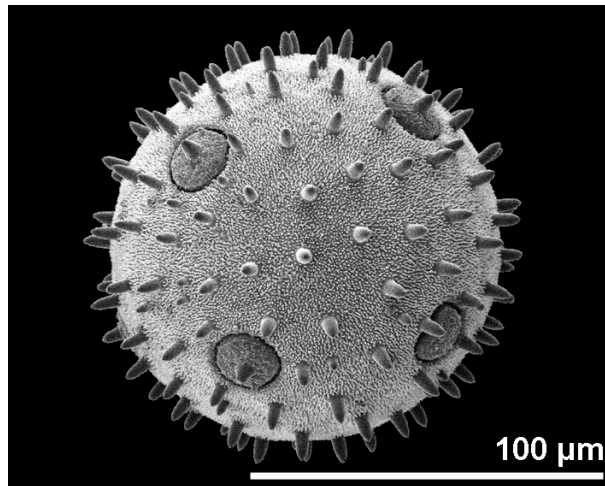
### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Pollenkörner von *Cucurbita pepo***

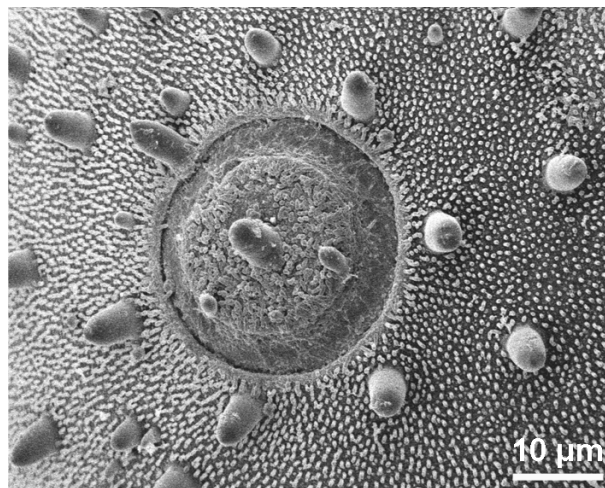
Alle Versuche wurden mit frischem Kürbispollen durchgeführt. Die Pflanze *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) stammt ursprünglich aus dem tropischen Amerika und hat viele Kulturformen (Sitte et al., 2002). Pollenkörner von *Cucurbita pepo* (Abb. 2-4) wurden für die Versuche gewählt, weil der Pollen von Kürbisgewächsen (*Psiguria sp.* und *Gurania sp.*) zu den bevorzugten Nahrungsquellen der *Heliconius*-Falter in ihren neotropischen Lebensräumen zählt (Boggs, 1981; Krenn et al., 2009) und ebenso wie bei *Psiguria* in Relation zu anderen Pflanzen sehr große Pollenkörner aufweist. *Psiguria* bildet große Pollentetraden mit einer Länge von 110-120 µm Länge (Estrada und Jiggins, 2002). Vorversuche zeigten, dass Kürbispollenkörner sensibel auf unterschiedliche Versuchsbedingungen in Experimenten reagieren und dadurch Veränderungen an der Struktur schnell und einfach sichtbar werden.

Die Blüten von *Cucurbita pepo* sind eingeschlechtig und werden von Insekten bestäubt (Sitte et al., 2002). Männliche Kürbisblüten besitzen fünf Staubblätter, die miteinander verwachsen sind (Abb. 8-10). Die in den Antheren gebildeten keimfähigen Pollenkörner sind die männlichen Gametophyten (Stanley und Linskens, 1985; Hesse et al., 2009). Pollenkörner sind von einer schützenden Wand umgeben, dem Sporoderm (Sitte et al., 2002). Dieses Sporoderm besteht aus zwei komplexen Schichten, der außen gelegenen Exine und der inneren Intine. Die Intine umhüllt den Protoplasten, ohne Lücken zu lassen und zeigt wenig Widerstandskraft gegen chemische Einflüsse. Sie besteht oft aus bis zu drei Schichten und die äußerste enthält viele Pektine, die dazu dienen, die Intine beim Keimen von der Exine zu lösen (Sitte et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist Cellulose (Roulston und Cane, 2000). Die Exine besteht aus sehr widerstandsfähigen Sporopolleninen (Sitte et al., 2002). Ihr äußerer Anteil, die Sexine, weist bei Kürbispollenkörnern viele, gleichmäßig über die Oberfläche verteilte Stacheln auf. Diese Strukturen und Pollenkitt haben die Funktion, dass die Pollenkörner besser aneinander und an Körpern und Haaren von Insekten haften (Sitte et al., 2002). Pollenkitt ist auch bei Kürbispollen vorhanden und als dottergelbe Masse erkennbar. Pollenkitt besteht aus Lipiden, Kohlenwasserstoffen, Terpenen und Carotinoiden (Roulston und Cane, 2000). Die Exine der Pollenkörner weist Poren auf (Roulston und Cane, 2000). Anzahl, Lage und Form solcher Keimöffnungen (Aperturen) sind ein wichtiges

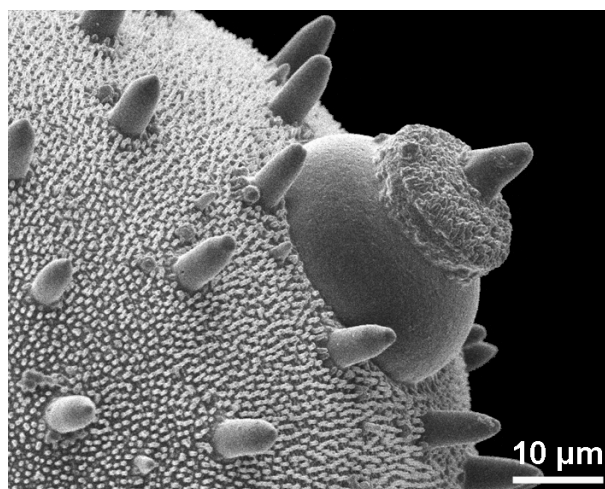
Unterscheidungskriterium (Sitte et al., 2002). Die Keimöffnungen sind Regionen an der Pollenoberfläche, die sich morphologisch und/ oder anatomisch stark von der übrigen Pollenwand unterscheiden. Sie dienen als Austrittsöffnung bei der Keimung und spielen eine Rolle bei der Harmomegathie, einem Mechanismus, der Änderungen der Größe und der Form von Pollenkörnern durch Veränderungen des Hydratisierungszustandes erlaubt (Hesse et al., 2009). Die Pollenkörner von *Cucurbita pepo* zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung von Aperturen auf ihrer Oberfläche. Der Fachterminus dafür lautet pantoaperturat oder pantoporat (Hesse et al., 2009). Jede Apertur eines Kürbispollenkorns wird von einem sogenannten Operculum bedeckt. Opercula sind Strukturen der Exine. Die Pollenkörner von *Cucurbita pepo* sind durch ihre überdurchschnittliche Größe gut geeignet, um sie unter dem Mikroskop zu untersuchen. Nach Stanley und Linskens (1985) weisen Pollenkörner von *Cucurbita pepo* einen Durchmesser von 213,8  $\mu\text{m}$ , ein Volumen von  $5117,0 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$  und ein Gewicht von  $1068,0 \times 10^{-9} \text{ g}$  auf. Pollenkörner von *Cucurbita pepo* L. haben einen Proteingehalt von 38,2 Prozent (Roulston et al., 2000).



**Abb. 2:** Pollenkorn von *Cucurbita pepo* (REM). Eigentum des Vereins zur Förderung der palynologischen Forschung in Österreich. Online unter der URL: <http://www.paladat.org/> [Zugriffsdatum: 08.05.10].



**Abb. 3:** Keimöffnung (Apertur), die durch ein Operculum verschlossen ist (REM). Eigentum des Vereins zur Förderung der palynologischen Forschung in Österreich. Online unter der URL: <http://www.paladat.org/> [Zugriffsdatum: 08.05.10].



**Abb. 4:** Geöffnete Apertur mit abgehobenem Operculum und austretendem Zellinhalt (REM). Eigentum des Vereins zur Förderung der palynologischen Forschung in Österreich. Online unter der URL: <http://www.paladat.org/> [Zugriffsdatum: 08.05.10].

### **2.1.2 Versuchstiere der Art *Heliconius melpomene*, Haltungs- und Zuchtbedingungen**

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Schmetterlinge der Art *Heliconius melpomene* (Linnaeus 1758) (Familie Nymphalidae, Unterfamilie: Heliconiinae) ausgewählt (Abb. 5, 6). Die Puppen für die Etablierung der Zucht von *Heliconius melpomene* wurden bei der Firma „London Pupae Supplies - The Granary Manor Farm“ in Oxford bestellt. Die Insekten wurden nach dem Schlüpfen individuell markiert und in einem Schmetterlingsgehege im Glashaus des Departments für Molekulare Systembiologie untergebracht. Im Schmetterlingsgehege (Abb. 7) dienten Passionsblumen (*Passiflora caerulea*) den Schmetterlingen, wie in den natürlichen Habitaten, zur Eiablage und als Nahrungspflanze für die Raupen. Als Nahrungsquellen für die Imagines standen ein Nektarspender, der mit aus verschiedenen Zuckern gemischtem *Lantana*-Nektar (Zusammensetzung nach Alm et al., 1990) gefüllt wurde, und mehrere Pflanzen der Art *Lantana camara* bereit, welche auch in freier Natur als natürliche Nektar- und Pollenquellen dienen. Die nötige Luftfeuchtigkeit von ungefähr 70 Prozent wurde durch den Einsatz eines Luftbefeuchters und tägliches Besprühen mit einem Zerstäuber erzielt.



Abb. 5: Imago von *Heliconius melpomene*, aus der Population des Departments für Evolutionsbiologie der Universität Wien.



Abb. 6: Imago von *Heliconius melpomene*. Die Tiere wurden nach dem Schlüpfen individuell markiert.



Abb. 7: Haltung der *Heliconius*-Population im Glashauss des Departments für Molekulare Systembiologie der Universität Wien.

## **2.2 Methode**

### **2.2.1 Beschaffung der frischen Kürbispollen**

Eine wichtige Vorbedingung für die Versuche war die Beschaffung von frischem Kürbispollen von einem Biobauernhof im Umland Wiens. Dazu wurde im Mai ein persönliches Treffen arrangiert. Bei diesem ersten Besuch erfuhr ich die voraussichtliche Beginnzeit der Blüte der Kürbispflanzen und somit den Zeitpunkt für die Versuchsdurchführung. In der Phase der eigentlichen Versuchsdurchführung wurde einmal wöchentlich die benötigte Menge an Kürbisblüten für die nächsten Versuchsdurchgänge geerntet. Dies geschah an sieben Terminen (29.06., 2.07., 7.07., 14.07., 21.07., 11.08., 18.08.2008) stets am späteren Nachmittag. Bei jeder Ernte wurden ungefähr 40 reife, gut ausgebildete, aber noch geschlossene männliche Blüten (Abb. 8) mit dem Blütenstiel abgeschnitten und in einem trockenen Kunststoffgefäß gesammelt. Es wurden nur geschlossene Blüten geerntet, um eine gleichbleibende Qualität des Pollens zu gewährleisten. Die Antheren der Blüten hatten zum Zeitpunkt der Ernte noch keine Pollenkörner freigesetzt. Über Nacht wurden die Blüten in Wassergläser gestellt, damit sich diese bis zum Morgen öffneten und die Antheren die fertig entwickelten Pollenkörner freisetzen konnten (Abb. 9 und 10). Die Pollenkörner wurden mit einem kleinen Spatel von den Antheren abgestreift, in Probengefäße gefüllt und konnten im Kühlschrank bei ca. 5 °C einige Tage gelagert werden. Stanley und Linskens (1985) beschreiben eine ähnliche Methode, um die Freisetzung von Pollenkörnern herbeizuführen.

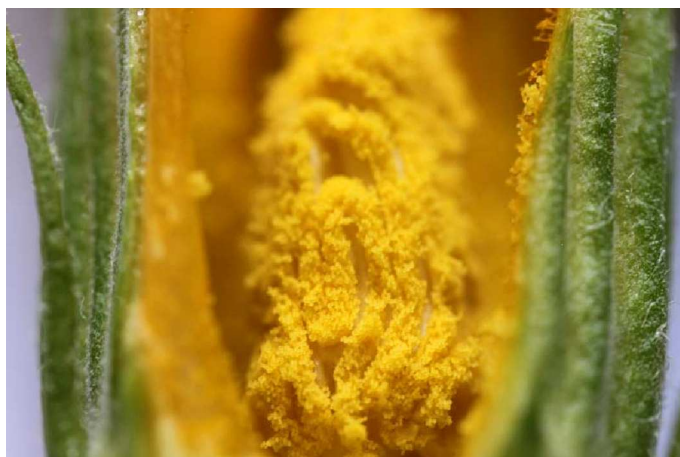




**Abb. 8:** Männliche Blüte von *Cucurbita pepo* in dem Zustand, in dem die Blüten geerntet wurden. Bereits aufgeblühte Blüten, wie jene im Hintergrund, sind wegen Tierfraß und mangelnder Frische nicht mehr geeignet.



**Abb. 9:** Im Längsschnitt geöffnete Kürbisblüte mit dem Andrözeum.



**Abb. 10:** Detailaufnahme der miteinander verwachsenen Antheren einer Kürbisblüte mit freigesetzten Pollenkörnern.

### 2.2.2 Durchführung der Versuche

Die Wirkung verschiedener Flüssigkeiten auf die Struktur frischer Pollenkörner von *Cucurbita pepo* sollte unter standardisierten Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde Kürbispollen für 200 Minuten in eine Flüssigkeit eingelegt und daraus mikroskopische Präparate hergestellt. Unter dem Lichtmikroskop (Mikroskop Eclipse 100) wurden mit Hilfe eines mechanischen Zählgerätes jeweils 200 Kürbispollenkörner je Präparat ausgezählt und nach zuvor festgelegten Kriterien als intakt oder verändert bewertet. Intakte Pollenkörner wurden als gut gerundet definiert (sind nicht deformiert), zeigen keine Risse der Oberfläche und weisen einen homogenen und vollständigen Inhalt auf. Es wurden pro Flüssigkeit 15 Durchgänge durchgeführt. Parallel zu den Flüssigkeitsversuchen wurde der Zustand von Pollenkörnern nach dem Pollenbearbeitungsprozess durch Individuen der Art *Heliconius melpomene* untersucht. Für die Versuche mit den Schmetterlingen wurden Pollenpakete mit einer Präpariernadel auf den Proboscis von Individuen aufgetragen und nach einer Zeitspanne von 200 Minuten wieder abgenommen, um daraus mikroskopische Präparate herzustellen und den Zustand der Pollenkörner unter dem Lichtmikroskop nach den oben genannten Kriterien als intakt oder verändert zu klassifizieren. An jedem Tag wurden mehrere Falter mit Pollenpaketen versehen. Einzelne Schmetterlinge wurden an verschiedenen Versuchstagen wiederholt mit Pollenproben bestückt. Es wurden letztlich 24 Präparate mit jeweils mehr als 50 Kürbispollenkörnern in die Statistik aufgenommen. In diesen Präparaten wurden jeweils alle vorhandenen Kürbispollenkörner klassifiziert. Diese Präparate wurden mit jenen Präparaten unbearbeiteter, für 200 Minuten in die diversen Flüssigkeiten eingelegter Pollenkörner gleicher Herkunft verglichen. Stark verklumpte Präparate wurden nicht gewertet. In allen aus den Kürbisblüten gewonnenen Pollenproben waren vereinzelt leere, vermutlich bereits auf den Antheren unreif gebildete Pollenkörner vorhanden (Beispiel siehe Abb. 20). Diese wurden als verändert mitgezählt.

Von den Präparaten wurden Aufnahmen mit einem Fotomikroskop der Marke Nikon Microphot-FXA und dem Computerprogramm NIS gemacht, um die Ergebnisse zu dokumentieren. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop CS4 bearbeitet.

Die bei den Versuchen verwendeten Flüssigkeiten waren Wasser, eine Protease-Lösung (13 mg der Protease Trypsin gelöst in 250 ml Wasser) und 25-prozentiger *Lantana*-Nektar (in der Zusammensetzung nach Alm et al., 1990) mit Aminosäuren. Als Kontrolle wurden

Pollenproben für 200 Minuten in Glycerin eingelegt. Glycerin wurde als Kontrollflüssigkeit gewählt, weil mit Glycerin hergestellte Pollenpräparate erfahrungsgemäß zumindest ein Jahr ohne sichtbare Beeinträchtigung oder Veränderung aufbewahrbar sind (Krenn et al., 2009). Auch Stanley und Linskens (1985) nennen Glyceringel neben Silikonöl als besonders geeignetes Einbettungsmedium für Pollenkörner. Die Konzentration der Protease-Lösung wurde an die Proteasekonzentration im Speichel einer Wanze angelehnt (Soyelu et al., 2007). Die dort angegebene Proteasekonzentration reicht von 1.4-94.9 µg/ml. In einer Nachuntersuchung (am 20. und 21. August 2008) wurde auch die Wirkung einer höheren Proteasekonzentration gelöst in Nektar (Protease-Nektar-Lösung) auf frisch geerntete Pollenproben getestet. Dazu wurden 15,6 mg Trypsin in 100 ml *Lantana*-Nektar (ohne zugesetzte Aminosäuren) gelöst und in 15 Durchgängen Pollenkörner für 200 Minuten darin eingelegt. Durch die Verwendung von Nektar anstelle von Wasser als Lösungsmittel sollte die bei den wässrigen Lösungen beobachtete, wahrscheinlich osmotisch bedingte, Zerstörung der Körner verhindert und eine bessere Einschätzung der Wirkung der enthaltenen Protease ermöglicht werden.

Die wässrige Protease-Lösung und der *Lantana*-Nektar wurden vor Beginn der Versuche portioniert und verschlossen im Kühlschrank gelagert. Für die Versuche wurde die benötigte Menge in einem Wasserbad aufgetaut. Von den am selben Tag frisch von den Antheren geernteten oder im Kühlschrank gelagerten Pollenkörnern wurde für jeden Versuchsdurchgang eine ungefähr gleiche Menge Pollenkörner entnommen. Dazu wurde der Deckel eines kleinen Eppendorfgefäßes als Maßgefäß für die Pollenproben verwendet. Die Vertiefung wurde mit einem Spatel bis zum Rand mit Pollenkörnern gefüllt. Es wurden fünf Pollenproben von aufgetautem Kürbispollen in diesen Deckel gefüllt und das Gewicht bestimmt. Die fünf Pollenproben hatten ohne Gefäß folgendes Gewicht: 0,0167 g; 0,0149 g; 0,0181 g; 0,0179 g und 0,0162 g. Jede Pollenprobe aus einem Eppendorfgefäß wurde in eine mit der jeweiligen Probeflüssigkeit beschriftete Embryoschale gefüllt und mit eigenen, mit den Namen der jeweiligen Flüssigkeit beschrifteten Einwegpipetten jeweils mit einem Milliliter der betreffenden Probeflüssigkeit versetzt. Die Proben in den Embryoschalen wurden mit Glasplatten abgedeckt und die Zeit der Zugabe der Flüssigkeiten notiert.

Nach Ablauf der 200 Minuten wurden die Pollenproben aus den Flüssigkeiten ausgewertet. Dazu wurde mit frischen Pipetten jeweils Pollen aus den Flüssigkeiten pipettiert, auf beschriftete Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Die Präparate

wurden mit dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung ausgewertet. Begonnen wurde mit der Auswertung der Präparate mit Wasser und Trypsin-Lösung, da diese rasch austrocknen. Danach wurden die Nektar- und Glycerinpräparate ausgezählt. Die Glycerinpräparate wurden zuletzt ausgewertet. Es wurden pro Tag zwei Durchgänge pro Flüssigkeit parallel angesetzt und die Präparate ausgezählt. Die Durchgänge 1 und 2 wurden nicht in die Auswertung aufgenommen, weil sie nicht nach den definierten Kriterien bewertet wurden. Die Durchgänge 11, 17 und 18 wurden gestrichen, weil die Pollenkörner an diesen Wochentagen nach mehreren Tagen im Kühlschrank bereits überlagert waren. Dies zeigte sich an einer veränderten Reaktion der Protoplasten bei Kontakt mit den Flüssigkeiten.

In der Zeit bis zur Entnahme der Pollenproben aus den Flüssigkeiten wurden die Versuche mit den Faltern und Kürbispollen im Glashaus durchgeführt. Die Versuche fanden vor 12 Uhr statt und die Auswertung der Pollenproben erfolgte am selben Tag. Je Versuchstag wurde ein zusätzliches Glycerinpräparat mit unbearbeiteten frischen Pollenkörnern im Glashaus hergestellt (Bezeichnung „Glycerin oben“). Mit einer mit Nektar befeuchteten Präpariernadel wurde Pollen auf die Saugrüssel aufgetragen. Die Befeuchtung mit Nektar gewährleistete eine bessere Haftung am Proboscis. Die Tiere selbst sondern bei der Bearbeitung Speichel ab (Eberhard et al., 2009 a). Nektar wurde gewählt, weil Wasser in Vorversuchen bereits als Befeuchtungsmittel ausgeschieden war, da es den Pollen stark zu verändern scheint und Glycerin das natürliche Pollenbearbeitungsverhalten vielleicht verfälschen könnte. Bei Beginn der Pollenbearbeitung (sichtbar durch entsprechende leichte Ein- und Ausrollbewegungen des Saugrüssels) wurden Zeitpunkt und Bezeichnung des Tieres notiert. Nach 200 Minuten Bearbeitungszeit wurden die *Heliconius*-Falter eingefangen und die Pollenpakete von den Saugrüsseln durch mehrmaliges Abstreifen mit einer sauberen Präpariernadel abgenommen und Glycerinpräparate erstellt.

In den Tabellen 1-3 und in Abbildung 24 wird im Folgenden der Übersichtlichkeit wegen die Bezeichnung „*H. melpomene*“ für Versuchsbedingung 1 mit den von Schmetterlingen bearbeiteten Kürbispollenkörnern verwendet; die Bezeichnungen „Glycerin oben“ und „Glycerin“ für die Glycerinkontrollgruppen (Versuchsbedingungen 2 und 3); Bezeichnung „Nektar + AS“ für die Versuchsbedingung 4 mit 25-prozentigem *Lantana*-Nektar mit Aminosäuren; Bezeichnung „Wasser“ für die Versuchsbedingung 5, bei der Pollenkörner 200 Minuten in Wasser eingelegt wurden; Bezeichnung „Protease + Wasser“ für die Protease-Lösung mit 13 mg Trypsin in 250 ml H<sub>2</sub>O (Versuchsbedingung 6); Bezeichnung „Nektar +

Protease“ für die Protease-Nektar-Lösung mit 15,6 mg Trypsin in 100 ml Nektar (Versuchsbedingung 7).

**Tab. 1: Anzahl der Versuchsdurchgänge bei den einzelnen Versuchsbedingungen. Von den durch Individuen von *Heliconius melpomene* bearbeiteten Pollenproben wurden N = 24 der hergestellten Präparate in die Wertung aufgenommen. Jedes dieser Präparate enthielt mindestens 50 Kürbispollenkörner, die als intakt oder verändert klassifiziert wurden. Bei den unterschiedlichen Flüssigkeiten wurden jeweils 15 Versuchsdurchgänge (N = 15) zu je 200 Minuten durchgeführt und in jedem Präparat 200 Pollenkörner als intakt oder verändert bewertet.**

Versuchsbedingung	N (Anzahl der Wiederholungen)
<i>H. melpomene</i>	24
Glycerin oben	15
Glycerin	15
Wasser	15
Protease + Wasser	15
Nektar + AS	15
Nektar + Protease	15

Die genauen Ergebnisse der einzelnen Versuchsbedingungen sind im Anhang dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit den Computerprogrammen Excel, SPSS 11.5 und R 2.7.0 durchgeführt und ist im Detail im Anhang angeführt.

Es wurde eine deskriptive Auswertung vorgenommen. Die Berechnungen in Tabelle 2 und die Grafik in Abbildung 23 wurden mit Excel erstellt. Es wurde ein Test auf Normalverteilung der Daten der einzelnen Gruppen mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test in Excel (und mit SPSS 11.5) durchgeführt. Die PG-Werte der einzelnen Gruppen lagen in Excel stets unter dem Tabellenwert. Es wird eine Normalverteilung angenommen.

Eine Anova-Varianzanalyse und ein Tukey-Test wurden mit SPSS 11.5 durchgeführt. Die Anova-Varianzanalyse gibt Auskunft darüber, ob ein Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Die Hypothese H1 lautet, dass zwischen den Versuchsgruppen ein signifikanter Mittelwertunterschied hinsichtlich des Merkmals besteht. Die Alternativhypothese H0 lautet, dass zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Mittelwertunterschied hinsichtlich des Merkmals besteht. Das Signifikanzniveau ist  $p < 0,05$ . Die Varianzanalyse ergibt einen F-Wert von 149 und einen Signifikanzwert von  $p < 0,001$  und zeigt somit einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. Der Tukey-Test ist ein an den T-Test angelehntes Verfahren und gibt an, wo die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der

Versuchsgruppen bestehen. In Tabelle 3 werden jeweils zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen, die durch einen Schrägstrich getrennt sind und sie zeigt die für die Grafik in Abbildung 24 wesentlichen Werte. Die Grafik in Abbildung 24 wurde mit dem Statistikprogramm R 2.7.0 erstellt.

Zur Bestimmung der persönlichen Fehlerquote bei der Bewertung des Pollenzustandes wurde ein Präparat (Bezeichnung 19 HG) zufällig ausgewählt und fünfmal ausgezählt. Von insgesamt 59 Pollenkörnern im Präparat wurden dreimal 33, einmal 34 und einmal 35 als verändert klassifiziert. Das entspricht einem möglichen Fehler von weniger als 10 %.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Zustand der Pollenkörner in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen**

Es gab insgesamt sieben Versuchsbedingungen. Die erste Versuchsbedingung ist das Experiment mit den Kürbispollenpaketen, die von einzelnen *Heliconius*-Faltern für 200 Minuten bearbeitet wurden. Die anderen sechs Versuchsbedingungen stellen die Versuche mit den unterschiedlichen Flüssigkeiten dar, in welche Proben von Kürbispollen für 200 Minuten eingelegt wurden.

##### **Versuchsbedingung 1: Versuche mit Kürbispollen und *Heliconius melpomene***

In der Versuchsbedingung mit der Bezeichnung „*H. melpomene*“ waren nach 200 Minuten zwischen 7,6 % und 97,7 % der Kürbispollenkörner verändert (Tab. 2). Der Medianwert betrug 77,9 % veränderte Pollenkörner. Bei den in die Wertung aufgenommenen Präparaten mit jeweils über 50 Pollenkörnern waren in 17 Präparaten über 50 % der Kürbispollenkörner verändert und in immerhin 10 Präparaten über 80 % der Pollenkörner verändert. Die für 200 Minuten durch Individuen von *Heliconius melpomene* bearbeiteten Pollenkörner zeigten unter dem Mikroskop teilweise einen hohen Grad an Veränderung. Ein großer Teil der Körner wurde durch den Bearbeitungsvorgang deformiert. Sie waren eingedellt und unförmig, wirkten teilweise gefaltet und zusammengeknüllt und wiesen auch Risse in der Hülle auf. Der Zellinhalt trat bei dem Bearbeitungsprozess teils aus, die Pollenkörner konnten auch völlig entleert sein. Die innerhalb größerer Pollenklumpen zu liegen kommenden Pollenkörner waren sehr oft unverändert. Zumindest die am Rand der Klumpen liegenden Pollenkörner wiesen jedoch die beschriebenen Veränderungen auf. Der Grad der Zerstörung von durch *Heliconius*-Falter bearbeiteten Pollenkörnern hängt bei klumpigen Pollenladungen eventuell teilweise von deren Lage ab. Wenn man statt mechanischer Beeinflussung die für die Bearbeitung am Proboscis abgesonderte Flüssigkeit als Ursache der Veränderung der Pollenkörner in Betracht zieht, könnte die Benetzung der Körner mit dieser Flüssigkeit nicht ausreichen, diese innen liegenden Körner zu befeuchten und so einen Effekt auf sie auszuüben. Die in Flüssigkeiten eingelegten Körner zeigten bei dem Kriterium „Deformation“ keinen so großen Grad an Veränderung wie jene der Versuchsbedingung 1 mit den Schmetterlingen. Die Abbildung 11 zeigt das typische Aussehen von Pollenkörnern, die für 200 Minuten von einem Falter bearbeitet wurden. Eines der Pollenkörner ist weitgehend intakt geblieben und gleicht eher den Kürbispollenkörnern aus den als Referenz dienenden

Glycerinkontrollgruppen (vergleiche Abbildung 12). Es zeigt einen homogenen und vollständigen Inhalt und ist gut gerundet. Der Zellinhalt tritt jedoch bereits leicht aus den Keimporen aus. In den Präparaten sind auch völlig intakte Pollenkörner zu finden.

#### Versuchsbedingungen 2 und 3: Versuche mit Glycerin

Nach 200 Minuten Einlegezeit in Glycerin (Versuchsbedingung „Glycerin oben“) waren zwischen 2,5 % und 10,5 % der Kürbispollenkörner verändert (Tab. 2). Der Medianwert lag bei 6,0 % an nicht intakten Pollenkörnern. Bei den Präparaten der zweiten Kontrollgruppe („Glycerin“) zeigten nach 200 Minuten zwischen 1,5 % und 11,5 % der Kürbispollenkörner Veränderungen (Tab. 2). Der Medianwert an veränderten Pollenkörnern lag bei 4,5 %. Die Präparate der beiden Gruppen, die aus in Glycerin eingelegten Pollenkörnern gefertigt wurden, dienten als Kontrolle. Die Pollenkörner veränderten sich großteils bei Einbettung in dieses Medium nach 200 Minuten nicht nach den als Veränderung festgelegten Kriterien. Die Pollenkörner waren nach 200 Minuten Einlegezeit in Glycerin gut gerundet und nicht deformiert und zeigten keine Risse der Oberfläche. Der Zellinhalt war homogen und blieb vollständig erhalten. Die Abbildung 12 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von unveränderten Pollenkörnern aus einem Präparat der Glycerinkontrollgruppen nach 200 Minuten Einlegezeit. Die Opercula waren in Glycerin wie in den anderen Gruppen jedoch großteils abgehoben, was darum nicht als Veränderung gewertet wurde.

#### Versuchsbedingung 4: Versuche mit 25-prozentigem *Lantana*-Nektar mit Aminosäuren

Bei der Versuchsbedingung mit der Bezeichnung „Nektar + AS“, bei der Kürbispollen für 200 Minuten in 25-prozentigen *Lantana*-Nektar (nach der Zusammensetzung nach Alm et al., 1990) mit Aminosäuren eingelegt wurde, waren im Minimum 3,5 % und im Maximum 18,0 % der Pollenkörner verändert (Tab. 2). Der Medianwert an veränderten Pollenkörnern lag bei 6,0 %. Diese Pollenkörner zeigten einen ähnlichen Habitus wie die Pollenkörner in den Glycerinkontrollgruppen und wiesen nur geringe Veränderungen auf. Die in Nektarflüssigkeit eingelegten Kürbispollenkörner waren in den Präparaten normal gerundet, also nicht deformiert und wiesen großteils einen vollständigen und homogenen Inhalt auf. Die Opercula waren wie in Glycerin häufig abgehoben und die Keimöffnungen somit geöffnet. Wenn dabei kein Zellinhalt deutlich ausgetreten war oder fehlte, wurden diese Pollenkörner ebenso wie in Glycerin als unverändert bewertet. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen Aufnahmen von



Pollenkörnern, die für 200 Minuten in 25-prozentigen *Lantana*-Nektar mit Aminosäuren eingelegt waren. In Abbildung 15 sind drei unveränderte Kürbispollenkörner zu sehen. Abbildung 16 zeigt ein leicht verändertes Pollenkorn, das gut gerundet ist. Allerdings tritt der Zellinhalt, anders als in den Glycerinkontrollpräparaten, aus den Keimöffnungen relativ weit nach außen. Die Veränderungen der Pollenkörner in den Nektarpräparaten waren geringer als bei den in Wasser und in wässrige Protease-Lösung eingelegten Kürbispollenkörnern.

#### Versuchsbedingung 5: Versuche mit Wasser

Bei der Versuchsbedingung „Wasser“ waren nach 200 Minuten Einlegezeit zwischen 89,0 % und 100,0 % der ausgezählten Kürbispollenkörner verändert (Tab. 2). Der Medianwert an veränderten Pollenkörnern lag bei 98,5 %. Die für 200 Minuten in Wasser eingelegten Pollenkörner zeigten ein hohes Maß an Veränderung bezüglich des Füllungszustandes der Pollenkörner. Die Pollenkörner waren zu einem sehr großen Prozentsatz leer, beziehungsweise war der Inhalt oft auch nur teils ausgetreten. In den Präparaten wurden lange Fäden und Ablagerungen aus der Masse des Zellinhalts außerhalb der Pollenkörner gefunden. Die Pollenkörner waren aber relativ gut gerundet und wenig deformiert. Es konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass schon bei Zugabe einer geringen Menge Wasser zu den Pollenkörnern umgehend eine Reaktion erfolgt. Die Pollenkörner scheinen dabei sehr schnell Wasser aufzunehmen, der Protoplast dehnt sich aus, die den Zellinhalt umgebende Membran reißt wahrscheinlich durch den erhöhten Druck in der Zelle und der Zellinhalt wird durch die Keimöffnungen ausgeschleudert. Die Opercula werden dabei abgehoben und oft fortgeschwemmt. Die Fotos in den Abbildungen 17 und 18 zeigen Aufnahmen des Zustandes von Pollenkörnern nach 200 Minuten in Wasser. Abbildung 17 zeigt drei Pollenkörner in unterschiedlich stark entleertem Zustand. Das oberste Pollenkorn ist vollständig entleert, während das mittlere nur eine geringe Menge Zellinhalt abgegeben hat. In Abbildung 18 ist der typische Austritt von Protoplasma durch eine Keimöffnung noch nachvollziehbar.

#### Versuchsbedingung 6: Versuche mit wässriger Protease-Lösung (13 mg Trypsin in 250 ml Wasser)

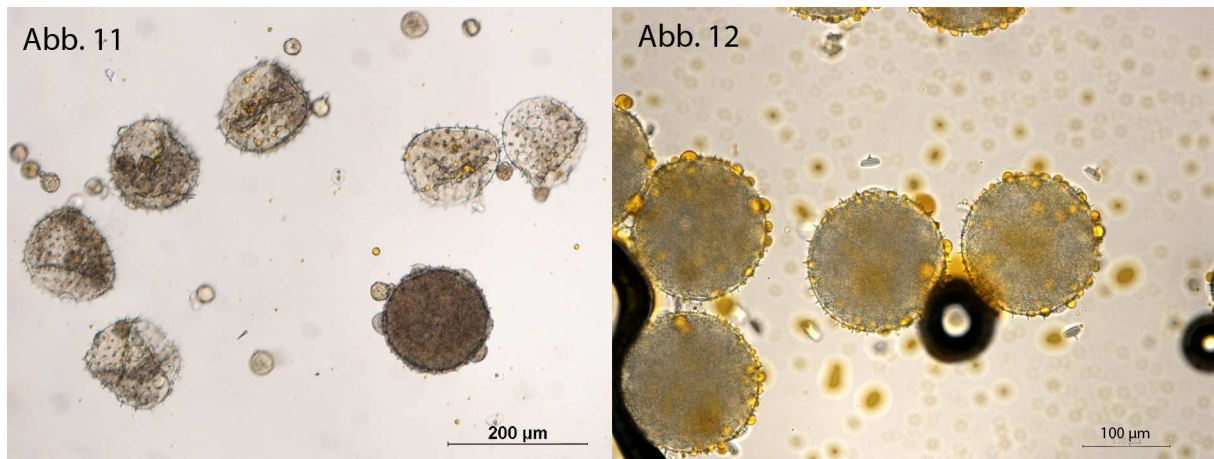
Nach 200 Minuten in wässriger Protease-Lösung (Bezeichnung „Protease + Wasser“) waren zwischen 93,5 % und 100,0 % der Kürbispollenkörner verändert (Tab. 2). Der Medianwert an veränderten Pollenkörnern lag bei 97,5 %. Die Pollenkörner waren nach Ablauf der

Einlegezeit in diesem Medium stark verändert und die meisten entweder teilweise oder völlig entleert. Häufig war bei den Pollenkörnern der Austritt des Zellplasmas durch Keimöffnungen zu beobachten. Der Zellinhalt wurde im Präparat verteilt und ist als graue, körnige Masse erkennbar. Auch hier konnte in einem gesondert durchgeführten Versuch unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass die Körner bei direkter Zugabe einer geringen Menge der wässrigen Protease-Lösung wie bei der Zugabe von Wasser mit einer schnellen Flüssigkeitsaufnahme reagieren und bei Überschreiten eines kritischen Füllungszustandes den Zellinhalt durch eine oder mehrere Keimöffnungen explosionsartig ausschleudern. Die Pollenkörner waren unterschiedlich stark entleert und wurden dabei manchmal leicht deformiert. Die Präparate ähneln stark jenen mit Kürbispollenkörnern, die in Wasser eingelegt waren (Abb. 17 und 18). In Abbildung 19 ist die Aufnahme eines Präparates mit Pollenkörnern nach 200 Minuten in wässriger Protease-Lösung zu sehen. Das Präparat wurde in eingetrocknetem Zustand fotografiert und diese Pollenkörner sind dadurch etwas stärker deformiert. In feuchtem Zustand sehen die Pollenkörner in diesen Präparaten aus wie jene nach Einlegen in Wasser und sind besser gerundet. Der Zellinhalt ist im Präparat verstreut und als dunkelgraue Masse erkennbar.

Versuchsbedingung 7: Versuche mit Nektar-Protease-Lösung (15,6 mg Trypsin in 100 ml Nektar)

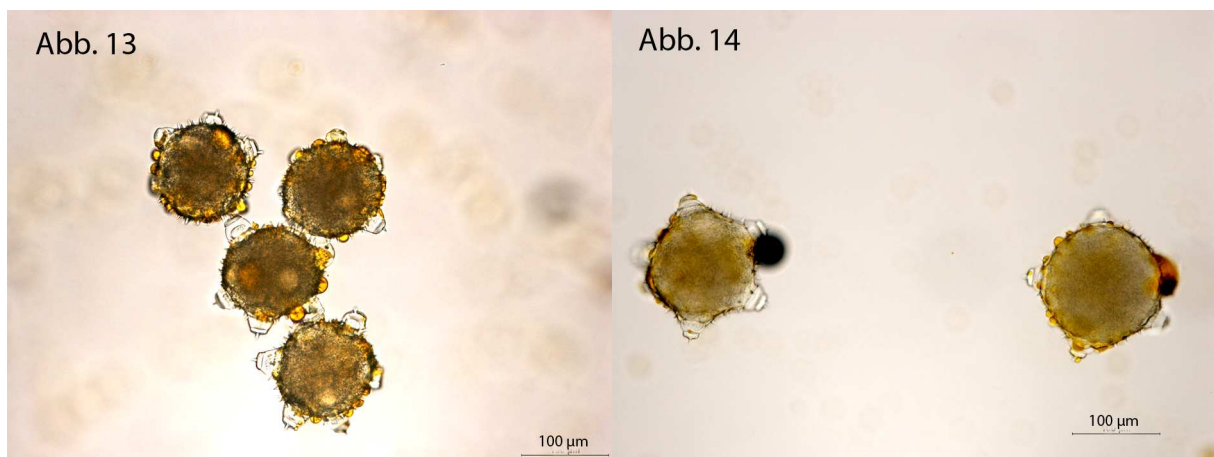
In dieser Versuchsbedingung wurden Kürbispollenkörner für 200 Minuten in ein Nektar-Protease-Gemisch eingelegt, das mehr Protease enthielt als die wässrige Protease-Lösung. Die Bezeichnung der Gruppe lautet „Nektar + Protease“. Von den Kürbispollenkörnern, die 200 Minuten in Nektar-Protease-Lösung suspendiert wurden, waren zwischen 4,5 % und 16,5 % verändert (Tab. 2). Der Medianwert an veränderten Pollenkörnern lag bei 8,0 %. Die in Nektar gelöste höhere Proteasekonzentration zeigte jedoch keinen großen optisch erkennbaren Effekt auf die Kürbispollenkörner. Die Pollenkörner waren zu einem großen Teil gut gerundet und wiesen einen weitgehend homogenen und vollständigen Inhalt auf. Die Opercula waren, wie in Glycerin und Nektar, abgehoben und blieben in den Präparaten meist in einem kleinen Radius um das Pollenkorn liegen. Die Aufnahmen in den Abbildungen 20 bis 22 zeigen Beispiele für Pollenkörner nach 200 Minuten in der Nektar-Protease-Lösung. Abbildung 20 zeigt sowohl Beispiele für intakte als auch veränderte Pollenkörner. Ein Pollenkorn (das unterste ganz rechts im Bild) ist untypisch verformt und völlig ohne Inhalt. Solche Pollenkörner kamen in allen Präparaten in geringer Anzahl vor und sind möglicherweise in

der männlichen Blüte unreif gebildete Pollenkörner. Abbildung 21 zeigt drei unveränderte Pollenkörner. Dem linken Pollenkorn in Abbildung 22 fehlt am unteren Rand Zellinhalt.



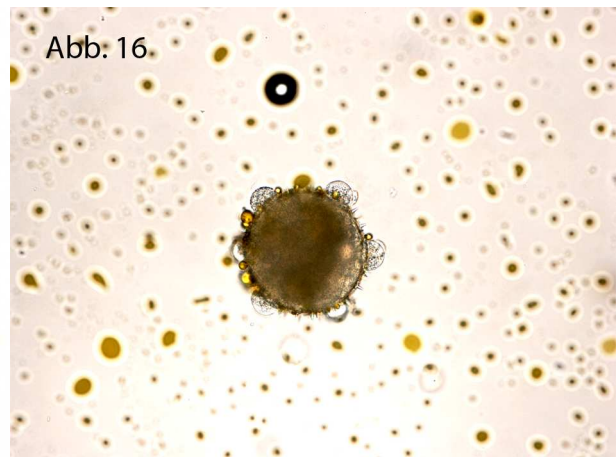
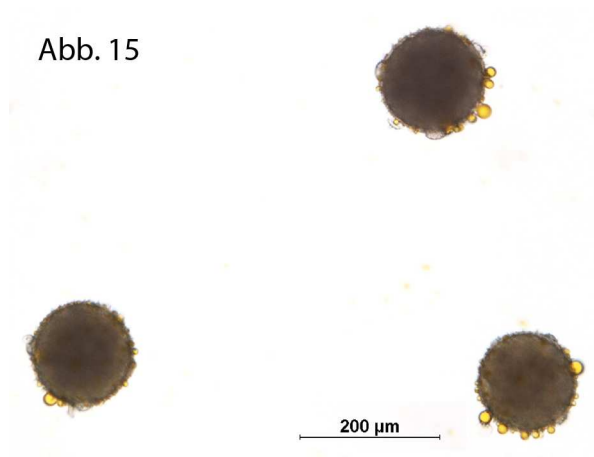
**Abb. 11:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern nach 200 Minuten Bearbeitung durch ein Individuum von *Heliconius melpomene* (Versuchsbedingung 1). Die Pollenkörner sind bis auf eines deformiert und größtenteils leer. Das dunkle Pollenkorn ist nur leicht verändert.

**Abb. 12:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern nach 200 Minuten in Glycerin (Versuchsbedingungen 2 und 3). Sie sind unverändert und dienen als Kontrollgruppe. Die Opercula sind teilweise abgehoben. Der Pollenkitt ist in den Präparaten als dottergelbe Masse erkennbar.



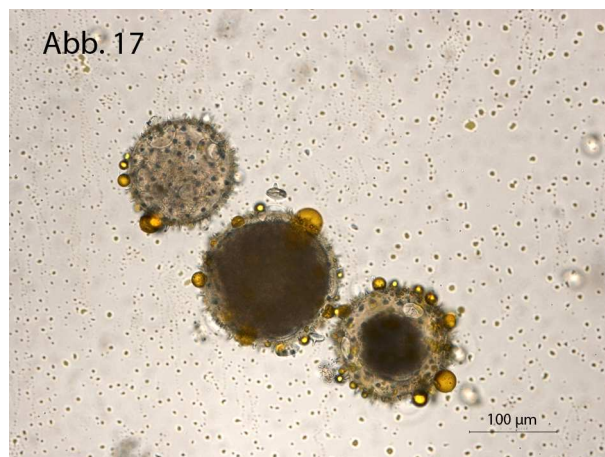
**Abb. 13:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern direkt nach dem Einlegen in Glycerin. Die Körner sind leicht unförmig. Zellinhalt, möglicherweise nur die Intine, tritt durch die Keimöffnungen stark nach außen.

**Abb. 14:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern einige Zeit nach dem Einlegen in Glycerin. Das rechte Pollenkorn ist bereits stärker aufgequollen als kurz nach der Einbettung in Glycerin. Nach 200 Minuten gleichen sich diese Körner dem Habitus der Pollenkörner der Kontrollgruppe (Abb. 12) an.



**Abb. 15:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern nach 200 Minuten in 25-prozentigem *Lantana*-Nektar (Versuchsbedingung 4). Die Pollenkörner haben einen homogenen und vollständigen Inhalt und sind gut gerundet. Der gelbe Pollenkitt ist gut erkennbar.

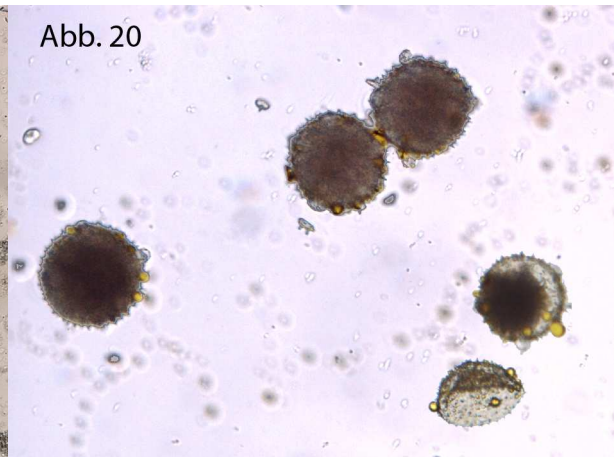
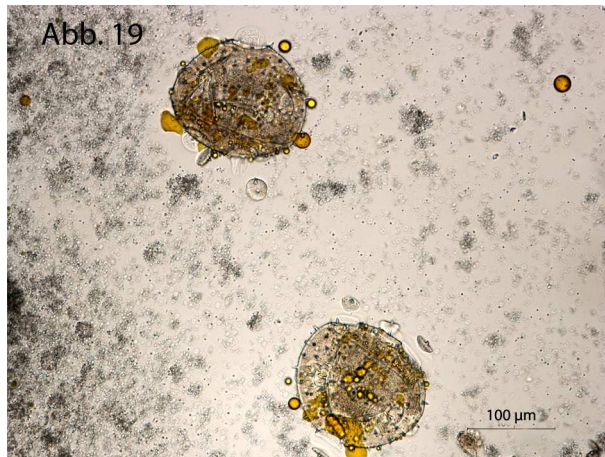
**Abb. 16:** Das Foto eines lichtmikroskopischen Präparates zeigt ein Beispiel für ein verändertes Pollenkorn nach 200 Minuten in 25-prozentigem *Lantana*-Nektar (Versuchsbedingung 4). Es wurde derselbe Maßstab verwendet.



**Abb. 17:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates, das drei unterschiedlich stark veränderte Pollenkörner nach 200 Minuten in Wasser zeigt (Versuchsbedingung 5).

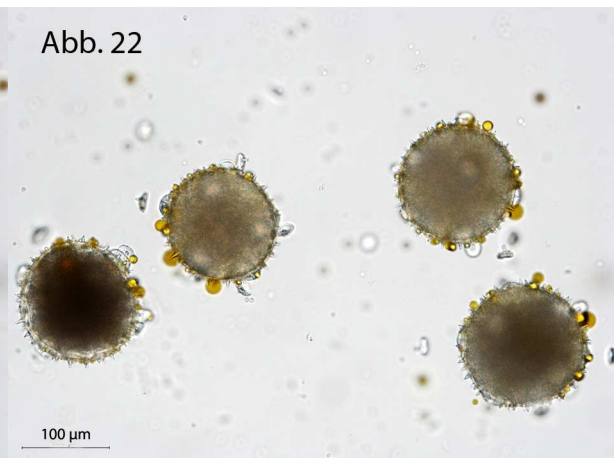
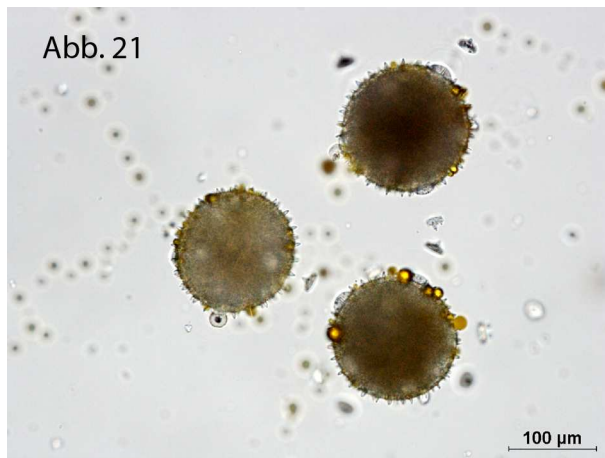
**Abb. 18:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates, das ein verändertes, aber gut gerundetes, Pollenkorn nach 200 Minuten in Wasser zeigt (Versuchsbedingung 5). Der Zellinhalt ist großteils ausgetreten und ist als dunkelgraue Zellmasse erkennbar.





**Abb. 19:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern nach 200 Minuten Einlegezeit in wässrige Protease-Lösung (Versuchsbedingung 6). Die Pollenkörner sind leer, der Zellinhalt ist als graue granuläre Masse im Präparat erkennbar. Das Präparat war bei der Aufnahme bereits etwas getrocknet, was die Deformation verstärkt haben dürfte. Die Pollenkörner gleichen im feuchten Zustand jenen in Abbildung 17 und 18.

**Abb. 20:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Kürbispollenkörnern nach 200 Minuten in Nektar-Protease-Lösung (Versuchsbedingung 7). Drei Körner sind gut gerundet mit homogenem Inhalt. Das unterste Pollenkorn im Bild rechts ist wahrscheinlich ein unreifes Pollenkorn. Dem Pollenkorn darüber fehlt ein Teil des Inhaltes, es ist stark verändert. Es wurde derselbe Maßstab verwendet.



**Abb. 21:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von drei als unverändert bewerteten Pollenkörnern nach 200 Minuten in Nektar-Protease-Lösung (Versuchsbedingung 7).

**Abb. 22:** Foto eines lichtmikroskopischen Präparates von Pollenkörnern nach 200 Minuten in Nektar-Protease-Lösung (Versuchsbedingung 7). Das erste Pollenkorn von links ist deutlich verändert. Der Inhalt ist im Randbereich inhomogen.

### 3.2 Vergleich der Pollenpräparate

Die im Anhang angeführten Tabellen (Tab. A1 bis A7) zeigen die gesammelten Daten aller sieben Versuchsbedingungen nach der Zeitspanne von 200 Minuten. Angeführt sind bei jeder Versuchsbedingung, wie viele der Pollenkörner unter Angabe der gesamt gezählten Zahl an Pollenkörnern in jedem Präparat in absoluten Zahlen und prozentuell verändert waren, sowie Minimum- und Maximumwert, die Summe, der Mittelwert, der Median, die Varianz, die Standardabweichung, die Quantile, die Präparatbezeichnung und die Anzahl der in die Wertung aufgenommenen Versuchsdurchgänge.

Das Boxplot-Diagramm in Abbildung 23 ist eine grafische Darstellung der Medianwerte und deren Verteilung und basiert auf den in Tabelle 2 angeführten Daten. Es werden im Diagramm der Median (50 %-Wert) sowie die Quantile (25 %-Werte) sowie das Minimum und das Maximum der Werte in Prozent angegeben. Der Strich in der Mitte zeigt den Median, die Box veranschaulicht die Streuung (Quantile), die Enden der senkrechten Linien oben und unten zeigen Minimum und Maximum der Werte. Das Diagramm veranschaulicht die große Streuung der Werte in den Präparaten der von *Heliconius melpomene* bearbeiteten Pollenproben (im Diagramm ganz links) und die geringere Streuung bei den sechs Versuchsbedingungen mit den unterschiedlichen Flüssigkeiten.

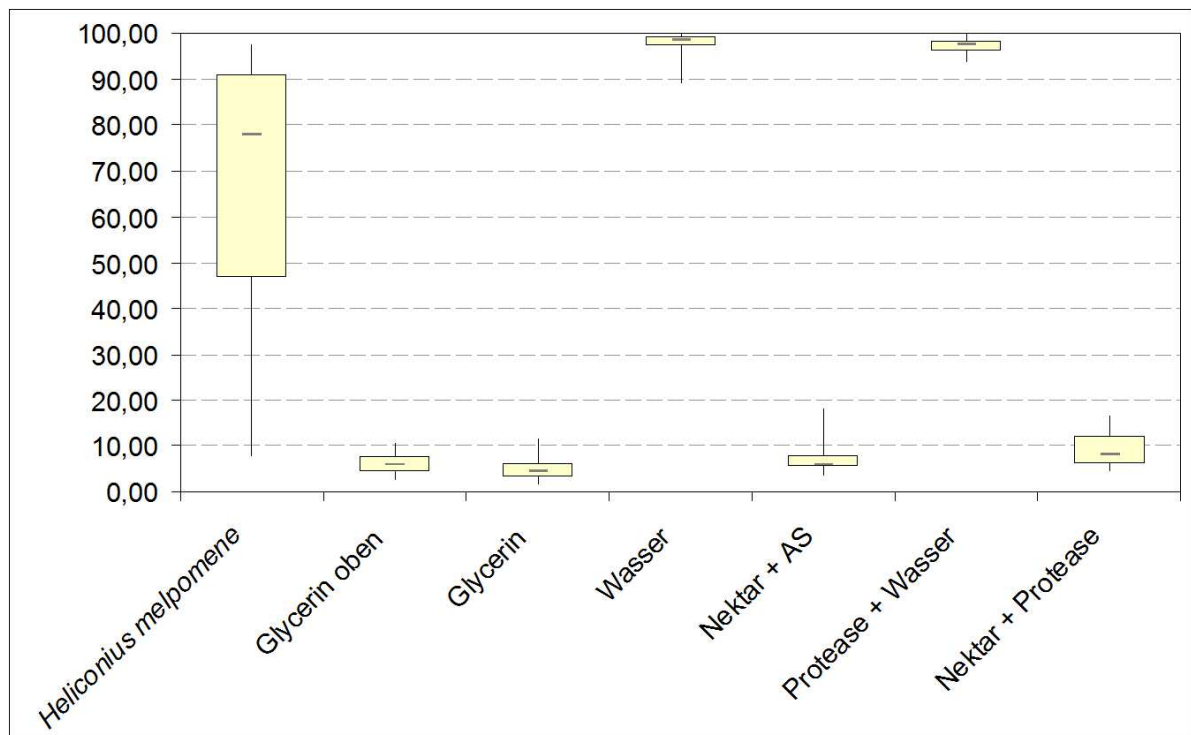
Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse des Tukey-Tests, die in Abbildung 24 grafisch dargestellt sind. Es wurden jeweils alle Versuchsbedingungen untereinander verglichen. Wesentlich für die Interpretation der Grafik in Abbildung 24 sind die waagrechten Fehlerbalken jeder Zeile. Liegt der Balken in der Mitte beim Wert 0, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden in der betreffenden Zeile angeführten Versuchsgruppen. Ist der Fehlerbalken links oder rechts (im negativen oder positiven Bereich), besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse, die in Tabelle 3 und der grafischen Auswertung der Versuche in Abbildung 24 dargestellt sind, zeigen, dass immer ein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsbedingung mit den für 200 Minuten von Schmetterlingen bearbeiteten Kürbispollenkörnern mit der Bezeichnung „*H. melpomene*“ und den verschiedenen Versuchsbedingungen mit den Flüssigkeiten besteht (jeweils  $p < 0,001$ ). Weiters wird deutlich, dass zwischen den Pollenproben der verschiedenen Durchgänge der Versuchsbedingungen mit den Bezeichnungen „Glycerin“ und „Glycerin oben“ ( $p = 1,000$ ), „Nektar + AS“ und „Glycerin oben“ ( $p = 1,000$ ), „Nektar + Protease“ und „Glycerin oben“

( $p = 0,997$ ), „Nektar + AS“ und „Glycerin“ ( $p = 0,999$ ), „Nektar + Protease“ und „Glycerin“ ( $p = 0,981$ ), „Protease + Wasser“ und „Wasser“ ( $p = 1,000$ ) sowie „Nektar + Protease“ und „Nektar + AS“ ( $p = 1,000$ ) kein signifikanter Unterschied besteht. Zwischen den Gruppen „Wasser“ und „Glycerin oben“, „Protease + Wasser“ und „Glycerin oben“, „Wasser“ und „Glycerin“, „Protease + Wasser“ und „Glycerin“, „Nektar + AS“ und „Wasser“, „Nektar + AS“ und „Protease + Wasser“, „Nektar + Protease“ und „Protease + Wasser“, „Nektar + Protease“ und „Wasser“ besteht jeweils ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ).



**Tab. 2:** In der Tabelle angeführt sind die Daten, auf denen das Box-Plot-Diagramm in Abbildung 23 basiert: Median, Minimum- und Maximumwert an prozentuell veränderten Pollenkörnern und die Quantile, gerundet auf eine Nachkommastelle.

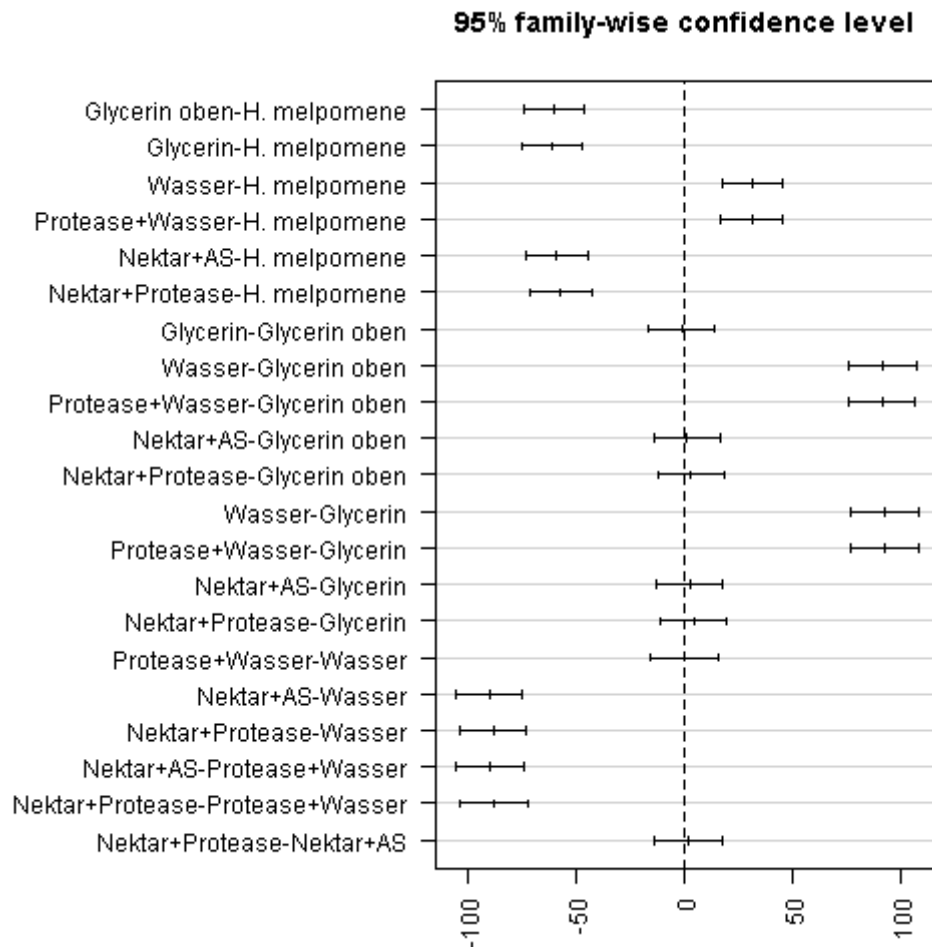
Versuchsbedingung	Median	Minimum	Maximum	Quantil 25%	Quantil 75 %
<i>H. melpomene</i>	77,9	7,6	97,7	46,9	90,8
Glycerin oben	6,0	2,5	10,5	4,5	7,5
Glycerin	4,5	1,5	11,5	3,3	6,3
Wasser	98,5	89,0	100,0	97,3	99,3
Protease + Wasser	97,5	93,5	100,0	96,0	98,3
Nektar + AS	6,0	3,5	18,0	5,5	7,8
Nektar + Protease	8,0	4,5	16,5	6,3	12,0



**Abb. 23:** Box-Plot Diagramm der Ergebnisse der Medianwerte in Prozent (Ordinate) der sieben Versuchsbedingungen (Abszisse). Die Bezeichnung „*Heliconius melpomene*“ wird für die Versuchsbedingung mit den für 200 Minuten von Schmetterlingen bearbeiteten Kürbispollenkörnern verwendet; Bezeichnungen „Glycerin oben“ und „Glycerin“ für die Glycerinkontrollgruppen; „Nektar + AS“ für die Versuchsbedingung mit 25-prozentigem *Lantana*-Nektar mit Aminosäuren; „Wasser“ für die Versuchsbedingung, bei der Pollen in Wasser eingelegt wurde; „Protease + Wasser“ für die Protease-Lösung mit 13 mg Trypsin in 250 ml H<sub>2</sub>O; „Nektar + Protease“ für die Protease-Nektar-Lösung mit 15,6 mg Trypsin in 100 ml Nektar. Die Einlegezeit betrug jeweils 200 Minuten.

**Tab. 3: Angabe der Ergebnisse der Mittleren Differenz, des Konfidenzintervalls und der Signifikanz des Tukey-Tests zwischen je zwei Versuchsgruppen.**

Versuchsgruppen	Mittlere Differenz	Untere Grenze des Intervalls	Obere Grenze des Intervalls	Signifikanz
Glycerin oben/ <i>H. melpomene</i>	-59,973	-73,966	-45,980	< 0,001
Glycerin/ <i>H. melpomene</i>	-61,173	-75,166	-47,180	< 0,001
Wasser/ <i>H. melpomene</i>	31,294	17,301	45,287	< 0,001
Protease + Wasser/ <i>H. melpomene</i>	31,060	17,068	45,053	< 0,001
Nektar + AS / <i>H. melpomene</i>	-58,740	-72,733	-44,747	< 0,001
Nektar + Protease/ <i>H. melpomene</i>	-56,873	-70,866	-42,880	< 0,001
Glycerin / Glycerin oben	-1,200	-16,724	14,324	1,000
Wasser/ Glycerin oben	91,267	75,743	106,790	< 0,001
Protease + Wasser/ Glycerin oben	91,033	75,510	106,557	< 0,001
Nektar + AS/ Glycerin oben	1,233	-14,290	16,757	1,000
Nektar + Protease/ Glycerin oben	3,100	-12,424	18,624	0,997
Wasser/ Glycerin	92,467	76,943	107,990	< 0,001
Protease + Wasser/ Glycerin	92,233	76,710	107,757	< 0,001
Nektar + AS/ Glycerin	2,433	-13,090	17,957	0,999
Nektar + Protease/ Glycerin	4,300	-11,224	19,824	0,981
Protease + Wasser/ Wasser	-0,233	-15,757	15,290	1,000
Nektar + AS/ Wasser	-90,033	-105,557	-74,510	< 0,001
Nektar + Protease / Wasser	-88,167	-103,690	-72,643	< 0,001
Nektar + AS/ Protease + Wasser	-89,800	-105,324	-74,276	< 0,001
Nektar + Protease/ Protease + Wasser	-87,933	-103,457	-72,410	< 0,001
Nektar + Protease/ Nektar + AS	1,867	-13,657	17,390	1,000



**Abb. 24: Grafik zur Veranschaulichung der Post-Hoc-Teststatistik (Tukey-Test): Mittelwertdiagramm der Differenzen (95 % Konfidenzintervall).** Die Grafik baut auf den Zahlen aus Tabelle 3 auf. Die Abszisse zeigt Differenzen/ Abweichungen von den Messwerten. Jede Zeile der Ordinate führt zwei miteinander verglichene Versuchsbedingungen an. Die beiden miteinander verglichenen Gruppen sind jeweils durch einen Bindestrich getrennt.

## 4. Diskussion

### **4.1 Versuche mit den Schmetterlingen (Versuchsbedingung 1)**

Es konnte bei den Versuchen mit den *Heliconius*-Faltern beobachtet werden, dass das Pollenbearbeitungsverhalten einen unterschiedlich großen Prozentsatz der Kürbispollenkörner, welche von den Saugrüsseln der einzelnen Tiere abgenommen wurden, zerstört. Die starke Deformation ist ein durchgängiges Merkmal veränderter Pollenkörner in den *Heliconius*-Präparaten. Die auf die Saugrüssel der Individuen aufgetragenen beziehungsweise von ihnen abgenommenen Pollenpakete, und somit auch die Pollenanzahl in diesen Präparaten, waren unterschiedlich groß. Methodisch wäre es kaum möglich gewesen, die Größe der Pollenpakete beim Aufbringen auf die Saugrüssel der Tiere oder beim Abnehmen durch Wiegen oder Abzählen exakt zu normieren, weil beides mit dem Verlust von jeweils einigen Pollenkörnern verbunden ist. Die nicht exakt regulierbare Anzahl an aufgetragenen Pollenkörnern, die unterschiedliche Bearbeitungszeit durch die einzelnen Schmetterlinge, der teilweise Verlust der Pollenpakete vor Ablauf der Zeitspanne von 200 Minuten oder ein eventuelles Nichtfortsetzen der begonnenen Bearbeitung aufgrund anderer Aktivitäten (etwa Paarungsverhalten oder weitere Nahrungsaufnahme) können unter anderem zu den sehr unterschiedlichen Gesamtzahlen an Kürbispollen in den Präparaten sowie der unterschiedlichen Anzahl an intakten und veränderten Pollenkörnern beitragen.

Krenn et al. (2009) führten Versuchsreihen mit Pollen unterschiedlicher Pflanzen durch, um den Einfluss der Pollenbearbeitung der Schmetterlinge auf den Zustand der Pollenkörner zu untersuchen. *Heliconius*-Falter und Individuen von *Laparus doris* wurden im Freiland der Forschungsstation La Gamba (Costa Rica) gefangen und ihnen Pollenpakete abgenommen. Von jedem Pollenpaket wurde ein Glycerinpräparat hergestellt und unter dem Mikroskop die vorhandenen Pollenarten bestimmt. Die Körner wurden dabei nach denselben Kriterien wie in der vorliegenden Diplomarbeit als intakt oder verändert klassifiziert. Als verändert galten Pollenkörner mit inhomogenem und/ oder austretendem Inhalt oder leere Pollenkörner oder solche mit deformierten Konturen beziehungsweise einer nicht intakten Exine. In jedem der Präparate wurden 50-100 Pollenkörner von den pollenliefernden Pflanzen *Psychotria*, *Lantana* und *Psiguria* oder *Gurania* als intakt oder beschädigt beurteilt. Diese Pflanzen werden zu den von *Heliconius*-Schmetterlingen bevorzugten pollenliefernden Pflanzen gezählt. Dies konnten Krenn et al. (2009) eindrucksvoll bestätigen: 85,31 % der Pollenkörner

in den Präparaten stammten von diesen Pflanzen. *Psiguria* und *Gurania* (Cucurbitaceae) wurden nicht unterschieden, ihr Anteil betrug 20,4 %. Als Kontrolle dienten Glycerinpräparate von frischen Pollenkörnern aus Antheren. Die Autoren heben hervor, dass die bearbeiteten Pollenkörner von den Schmetterlingsrüsseln anders aussehen als jene Pollenproben aus den Kontrollpräparaten und signifikant mehr zerstörte Pollenkörner aufweisen ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U-Test). Auch Versuchsreihen mit Tieren aus dem Freiland, denen Pollenpakete aufgetragen wurden ( $p = 0,015$ ) und andererseits mit Individuen, die selbst unter Laborbedingungen Pollen sammelten ( $p < 0,001$ ), ergaben nach 200 Minuten Bearbeitung signifikant mehr zerstörte Pollen als in den Kontrollgruppen. Es wurde beobachtet, dass der Zustand von Pollenkörnern von *Psychotria*-, *Gurania*-/ *Psiguria*- und *Lantana*-Pflanzen nach der Pollenbearbeitung durch *Heliconius*-Falter vergleichbar ist. Bei allen Pollenkörnern waren der Beschreibung nach die Exinen auf dieselbe Weise verändert und der Inhalt auf dieselbe Weise beeinflusst.

Krenn et al. (2009) folgern aus ihren Ergebnissen, dass das Pollenbearbeitungsverhalten der untersuchten Arten die Pollenkörner zerstört und den Schmetterlingen Zugang zu den Nährstoffen im Inneren ermöglicht. Die untersuchten Pollenkörner werden dabei zu einem großen Prozentsatz als aufgebrochen und der Inhalt als teilweise aufgelöst beschrieben. Die Autoren schlagen als Ursache für die Zerstörung der Pollenkörner die von Eberhard et al. (2007) im Speichel nachgewiesene Protease vor und begründen dies dadurch, dass von Schmetterlingen selbst gesammelter Pollen stärker zerstört wird als Pollenproben, die auf die Saugrüssel künstlich aufgetragen wurden. Nach den Ergebnissen von Penz und Krenn (2000) resultiert das eigenständige Pollensammelverhalten in einer stärkeren Abgabe von Speichel. In der Studie von Krenn et al. (2009) führte eine frühzeitig eingestellte Pollenbearbeitung durch die Schmetterlinge dazu, dass die Pollenkörner mit einer Veränderungsrate von 10-20 % stark jenen der Kontrollgruppe ähnelten. Die Autoren geben an, dass eine Beziehung zwischen der Dauer der Pollenbearbeitung und der Pollenzerstörung und dem Erhalt des Zuganges zu den Nährstoffen im Inneren besteht.

Die Beobachtungen von Krenn et al. (2009) über den stark veränderten Zustand der Pollenkörner nach der Bearbeitung decken sich mit jenen, die in den Versuchen zur Pollenbearbeitung der vorliegenden Diplomarbeit gemacht wurden. Auch die Art der beobachteten Zerstörung ist der Beschreibung nach ähnlich. Die 200 Minuten dauernde Pollenbearbeitung zerstört auch bei den Versuchen mit *Heliconius melpomene* einen großen Teil der Pollenkörner. Krenn et al. (2009) schließen aus dem Zustand der veränderten

Pollenkörner, dass diese nicht mehr der Bestäubung der Nahrungspflanzen dienen können. Aus den Ergebnissen der Versuche mit *Heliconius melpomene* und Kürbispollen lässt sich dieser Schluss ebenfalls ableiten. Zur häufig diskutierten Rolle der Falter als Bestäuber ist anzumerken, dass an den für diese Diplomarbeit angefertigten Präparaten von den durch *Heliconius*-Falter bearbeiteten Kürbispollenkörnern beobachtet werden konnte, dass nach 200 Minuten Bearbeitungszeit meistens auch intakte Pollenkörner in den Präparaten vorhanden sind. Es erscheint durchaus möglich, dass die Schmetterlinge intakte Pollenkörner zu einer kompatiblen Blüthenarbe transportieren und somit als Bestäuber ihrer Nahrungspflanzen fungieren können. Gilbert (1972) und Murawski (1993) erwähnen *Heliconius*-Falter als Bestäuber der Gattungen *Anguria* und *Gurania*. Weiters dafür sprechen könnte, dass in mehreren Präparaten neben zuvor aufgebrauchten Kürbispollenkörnern auch eine größere Zahl an *Lantana*-Pollen gefunden werden konnte, was zeigt, dass die Tiere unter diesen Laborbedingungen nach oder während der Bearbeitung der Pollenpakete neue Pollenladungen aufgenommen haben. Der *Lantana*-Pollen in den Präparaten wurde bei der Auswertung nicht mitgezählt.

## **4.2 Versuche mit den Flüssigkeiten (Versuchsbedingungen 2-7)**

### **4.2.1 Glycerinkontrollgruppe**

Die beiden Glycerinkontrollgruppen wurden, anders als ursprünglich geplant, jeweils nach 200 Minuten ausgezählt. Die Begründung für diese Änderung im Vorgehen liegt darin, dass die Pollenkörner, die frisch in Glycerin eingebracht werden, gegenüber den als Kontrollgruppe definierten Körnern teilweise Unterschiede in der Form aufweisen, wie der Vergleich der Abbildungen 13 und 14 (Pollen frisch in Glycerin) mit Abbildung 12 (Pollen nach 200 Minuten in Glycerin) zeigt. Nach 200 Minuten entsprachen aber auch solche Kürbispollenkörner den als unverändert festgelegten Kriterien und konnten als Referenz dienen. Nach 200 Minuten zeigten auch die als intakt bewerteten Kürbispollenkörner in den Präparaten der anderen Versuchsbedingungen den gleichen Habitus wie jene intakten Pollenkörner aus den Glycerinkontrollgruppen nach 200 Minuten.

Das Phänomen des Zustands der Kürbispollenkörner frisch in Glycerin könnte eventuell osmotische Ursachen haben, die im Chemismus des Zellinhalts und des Einbettungsmediums begründet sind. Nepi et al. (2001) schreiben, dass Antheren dehydrieren, wenn der Pollen reif ist und eine partielle Dehydrierung sehr häufig auch den Pollen selbst betrifft. Die

Pollenkörner verlieren dabei an Volumen und ändern ihre Form. Bei der Verbreitung spielt die relative Feuchte der Umwelt eine Rolle. Für *Cucurbita pepo* berichten die Autoren von einer partiellen Hydrierung während der Verbreitung mit einem Volumenverlust von weniger als 10 Prozent. Die Reaktion von Pollenkörnern auf ihre Umwelt hängt vom Wassergehalt und biochemischen sowie physiologischen Schutzmechanismen ab. Diese Ausführungen von Nepi et al. (2001) machen deutlich, dass der Wassergehalt von Pollenkörnern natürlichen Schwankungen unterliegt und eventuell den beobachteten Zustand der Kürbispollenkörner frisch in Glycerin erklärt. Auf der Homepage des „Biotechnology und Life Sciences Portal Baden-Württemberg“ (Online unter der URL: [http://www.cluster-biopolymere.de/magazin/wissenschaft/archiv\\_2008/index.html?lang=en&artikelid=%2Fartikel%2F01445%2Findex.html&linkGlossaryTerms=1](http://www.cluster-biopolymere.de/magazin/wissenschaft/archiv_2008/index.html?lang=en&artikelid=%2Fartikel%2F01445%2Findex.html&linkGlossaryTerms=1) [Zugriffsdatum 23.03.2010]) wurde die Information gefunden, dass bei Versuchen mit Pollenkörnern diese bei Einbettung in eine Glycerin-Gelatine-Schicht aufquellen und rehydriert werden. Diese Beschreibung stützt die in den Versuchen mit Kürbispollen gemachten Beobachtungen über die Veränderung der Pollenkörner nach dem Einlegen in Glycerin. Theoretisch möglich wäre, dass der Habitus der Pollenkörner frisch in Glycerin mit der Lagerung zusammenhängt.

#### **4.2.2 Versuche mit Wasser, Nektar und Protease**

Auf den ersten Blick scheint die hohe Veränderungsrate der Pollenkörner in der wässrigen Protease-Lösung auf die Protease zurückzuführen zu sein und die Hypothese zu bestätigen, dass eine Protease im Speichel der *Heliconius*-Falter wesentlich bei der Pollenbearbeitung und für die Extraktion der Inhaltsstoffe aus den Pollenkörnern ist. Der große Grad an Zerstörung bei der wässrigen Protease-Lösung lässt wegen der gegebenen Ähnlichkeit zu der Gruppe mit den in reines Wasser eingelegten Pollenproben aber nicht den Schluss zu, dass die Protease hier einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis dieser Versuchsreihen hatte. Bereits in einer früheren Untersuchung wurde festgestellt, dass Kürbispollenkörner in Wasser schnell platzen (Eberhard et al., 2007). Die wässrige Basis der Protease-Lösung könnte also der entscheidende Faktor für das beobachtete Ergebnis bei den Pollenkörnern nach 200 Minuten in der wässrigen Protease-Lösung sein.

*Lantana*-Nektar mit Aminosäuren hat keinen großen optisch erkennbaren Effekt auf die Kürbispollenkörner, allerdings zeigten etwas mehr Pollenkörner in dieser Gruppe Schwellungen an den Keimöffnungen. Die Schwellungen ähneln auch Beschreibungen von

Protrusionen durch osmotischen Druck von Roulston und Cane (2000). Dieses Phänomen könnte auch bei den Kürbispollenkörnern durch Änderungen des osmotischen Drucks verursacht werden. Bei sehr geringer Schwellung wurde diese nicht als Veränderung gewertet, da dies auch in den Glycerinkontrollgruppen vorkam und auch dort nicht als Veränderung gewertet wurde. Die Pollenkörner, die in Nektar-Protease-Lösung eingelegt waren, zeigten im Rahmen der festgelegten Kriterien keine Ähnlichkeiten zu den Pollenkörnern aus der wässrigen Protease-Lösung, wenn bei den Absolutwerten bei der Nektar-Protease-Gruppe auch tendenziell etwas mehr veränderte Pollenkörner gezählt wurden als bei Glycerin oder *Lantana*-Nektar. Diese Veränderungen waren jedoch nur gering und subjektiv als grenzwertig zu beurteilen. Die der vorliegenden Diplomarbeit zugrundeliegenden Versuche mit Kürbispollen und den unterschiedlichen Flüssigkeiten konnten meiner Ansicht nach keine Hinweise liefern, dass die Protease Trypsin hilft, die für die Versuche verwendeten Kürbispollenkörner zu öffnen. Die Zerstörung von Kürbispollenkörnern in der wässrigen Protease-Lösung ist wahrscheinlich auf das Wasser zurückzuführen, das sie zum Platzen bringt. Bei den Versuchen mit Nektar-Protease-Lösung zeigte diese trotz höherer Trypsinkonzentration keinen herausragenden Effekt auf die Kürbispollenkörner. Es ist anzumerken, dass Pollenkörner dieser Gruppe in Abbildung 22 etwas heller als andere wirken. Bei der Auswertung der Präparate unter dem Lichtmikroskop und anderer Helligkeit war dieser farbliche Unterschied nicht auffällig. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass diese geringe farbliche Abweichung eine Veränderung der Pollenkörner darstellt, etwa eine Verdauung des Zellinhaltes, die eventuell von der Protease Trypsin ausgelöst wird. Die Pollenkörner sind jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls gut gerundet.

Ein Austausch von chemischen Substanzen zwischen dem Inneren der Pollenkörner und der Umgebung, wie etwa von Gilbert (1972) oder Stanley und Linskens (1985) beschrieben wird, beziehungsweise eine chemische Veränderung der Zusammensetzung des Zellinhaltes, ist bei den Versuchen mit den Flüssigkeiten durch die rein optische Untersuchung unter dem Mikroskop nicht völlig auszuschließen. Die Opercula der Pollenkörner waren in allen Flüssigkeiten abgehoben und werden leicht fortgeschwemmt. Dies ist auch in der Glyceringruppe zu beobachten und darum wurde das Fehlen der Opercula nicht als Kriterium für eine Veränderung eines Pollenkorns gewertet. Das Fehlen der Opercula könnte den Austritt von Zellinhalt oder einen Stoffaustausch erleichtern. Die Sensitivität der Kürbispollenkörner könnte diesbezüglich auch als gewisser Nachteil angesehen werden und die Ergebnisse verfälschen. Zur angewandten Methode ist anzumerken, dass auch bei anderen



Pollenarten ähnliche Beobachtungen in Bezug auf das Verhalten der Pollenkörner gemacht wurden (Krenn et al., 2009).

#### **4.3 Mögliche Einflussfaktoren auf den Extraktionsprozess der Nährstoffe aus den Pollenkörnern**

Der erfolgreiche Nachweis einer Protease im Speichel durch Eberhard et al. (2007) macht es sehr wahrscheinlich, dass diese Protease für die Verdauung der Pollenkörner beziehungsweise deren Inhalts von Bedeutung ist. Krenn et al. (2009) sind der Ansicht, dass die Protease für den Bearbeitungsprozess und die Öffnung der Pollenkörner wesentlich ist.

Meiner Ansicht nach könnten die Beobachtungen über den stark veränderten Zustand der Kürbispollenkörner nach 200 Minuten Bearbeitungszeit durch die Schmetterlinge auch darauf hindeuten, dass im Falle der Kürbispollenkörner eine rein mechanische Öffnung der Pollenkörner und das Auspressen des Inhaltes durch die Ein- und Ausrollbewegungen des Saugrüssels und des dadurch erzeugten Druckes auf die Pollenkörner ausreichen, um den Inhalt freizusetzen. Die Deformation der Pollenkörner bei der Pollenbearbeitung ist ein auffälliges Kriterium und scheint eine wichtige Rolle bei der Extraktion der Nährstoffe zu spielen. Es ist denkbar, dass die im Speichel nachgewiesene Protease für die Verdauung des Zellinhaltes verwendet wird. Es ist aber bis dato nicht geklärt, warum dies extraoral geschieht, wenn die Annahme zutrifft, dass die Öffnung der Pollenkörner mechanisch durch die Bearbeitungsbewegungen ausreichend gewährleistet ist und der austretende Zellinhalt ingestiert werden kann. Es ist nicht auszuschließen, dass die im Speichel vorhandene Protease, wie Krenn et al. (2009) vorschlagen, entscheidend für eine erfolgreiche Pollenbearbeitung und Öffnung der Pollenkörner ist.

Roulston und Cane (2000) liefern einen Überblick über die häufigsten Möglichkeiten, wie Tiere an den Inhalt von Pollenkörnern gelangen können. Genannt werden die mechanische Zerstörung der Pollenwand, das Durchstoßen der Pollenwand mit Mundwerkzeugen, das Auflösen der Wand mit Enzymen, die Induzierung von Keimung oder Pseudokeimbildung, das Öffnen durch osmotischen Schock und das Penetrieren der Wand mit Verdauungsenzymen. Theoretisch halte ich eine Kombination von mechanischer Veränderung und derartigen anderen Prozessen bei den pollenfressenden *Heliconius*-Faltern für denkbar. Es ist anzumerken, dass die äußeren Strukturen von Pollenkörnern, besonders die Exine, sehr widerstandsfähig und inert gegen chemische Einflüsse sind und die Verdauung der Exine

durch eine Exinase bei manchen Collembolen bekannt ist (Johnson und Nicolson, 2001). Stanley und Linskens (1985) schreiben, dass Insekten zumeist keine Möglichkeit haben, Cellulose, Pektin und das Sporopollenin der Pollenmembran zu verdauen und somit die Nährstoffe des Pollenkorns durch die Zellwand oder deren Öffnungen hindurch extrahieren müssen.

Johnson und Nicolson (2001) beschreiben ein Anschwellen von Pollenkörnern nach ihrer Befeuchtung und eine Ruptur der Pollenwand durch einen osmotischen Schock durch Unterschiede in der Osmolarität der Umgebung, etwa im Verdauungstrakt von Insekten. Sie zitieren Befunde von Gilbert und DeVries über *Heliconius*-Schmetterlinge, wonach diese die Pollenkörner befeuchten, was in der Folge zu deren Anschwellen und zum Austreten des Inhaltes führen würde, der dann einfach ingestiert werden kann. Die spezialisierten Bearbeitungsbewegungen der *Heliconius*-Falter während der Pollenbearbeitung werden von Johnson und Nicolson in dieser Publikation jedoch nicht erwähnt. Roulston und Cane (2000) schreiben, dass Pollenkörner bei *Heliconius*-Faltern ihren Inhalt durch Keimung entlassen und nicht durch Degradation der Pollenkörner. Sie beschreiben Experimente zur Induzierung von Keimung- oder Pseudokeimung durch Suspension in Sucroslösung. Stanley und Linskens (1985) bezeichnen das Austreten eines intakten Pollenschlauchs aus einem Pollenkorn nach Einwirken einer starken Säure als Pseudokeimbildung. Sie beschreiben, dass noch nicht gekeimte Pollenkörner als Reaktion auf Kontakt mit einer verdünnten anorganischen Säure mit dem Aufplatzen der Pollenkörner und mit dem Ausschleudern des Protoplasmas reagieren. Dies wird auf die Aufnahme von Wasserstoffionen und einen dadurch bedingten Druckanstieg oder einen Aufquellvorgang von Membrankolloiden zurückgeführt. Die Beschreibung ähnelt der Reaktion von Pollenkörnern in Wasser und wässriger Protease-Lösung. Ob der Speichel einen sauren pH-Wert aufweist und somit eine Pseudokeimung auslösen kann, ist mir nicht bekannt. Da inzwischen durch Eberhard et al. (2009 a) belegt werden konnte, dass nicht Nektar, sondern Speichel für die Pollenbearbeitung der *Heliconius*-Falter verwendet wird, können diese Prozesse als Ursache für die Freisetzung der Nährstoffe aus den Pollenkörnern bei der Pollenbearbeitung durch die Falter ausgeschlossen werden. Interessant ist, dass Roulston und Cane (2000) eine Schwächung der Intine durch Proteasen vorschlagen. Sie bezeichnen die Intine als wichtigste zu überwindende Barriere gegen Verdauungsenzyme der Insekten, welche sie als Ursache für Änderungen in der Pollenwand hervorheben. Nicht völlig außer Acht gelassen werden können ihrer Meinung nach aber auch Modifizierungen der Pollenwand durch Enzyme, die der Pollen selbst, etwa während der Keimung, produziert. So zitieren sie Befunde, dass in einem frühen Stadium der Keimung das

Sporopollenin amorph wird beziehungsweise die Intine hydrolytische Enzyme enthält, die nahe den Keimöffnungen aktiv sind.

Diese verschiedenen Annahmen bieten in Hinblick auf die in dieser Diplomarbeit und der Arbeit von Krenn et al. (2009) gemachten Beobachtungen über die starke Deformation der Pollenkörner nach einer Bearbeitung durch die Schmetterlinge keine befriedigende Erklärung. Eine Beeinflussung der Intine oder anderer Strukturen durch Proteasen kann in den für diese Diplomarbeit durchgeführten Versuchen mit *Heliconius*-Faltern beziehungsweise den Protease-Lösungen nicht völlig ausgeschlossen werden. In den Versuchen mit Kürbispollenkörnern und den Schmetterlingen erscheint die starke Deformation und Faltung der Körner aber als wesentlicher Faktor für einen Austritt des Zellinhaltes. Krenn et al. (2009) kommen in ihrer Arbeit über den Zustand von Pollenkörnern nach der Bearbeitung durch die Schmetterlinge zu dem Schluss, dass es sich dabei weder um einen Diffusionsprozess noch eine beginnende Keimung der Pollenkörner handelt. Sie beschreiben, dass die Pollenkörner eindeutig aufgebrochen sind und der Zellinhalt bei diesem Prozess austritt. Diffusions-, Keimungs- und Pseudokeimungsprozesse erscheinen aufgrund der starken Deformation der Pollenkörner beim Bearbeitungsprozess durch die *Heliconius*-Falter als wenig wahrscheinliche Ursache für den Austritt des Zellinhaltes aus den Pollenkörnern. Es ist aber nicht völlig auszuschließen, dass sie zusätzlich eine Rolle spielen. Ob die Pollenkörner bei der Bearbeitung anschwellen und sich ein osmotischer Druck aufbaut, der eine Rolle bei der Öffnung spielt, oder die Pollenkörner noch anderweitig beeinflusst werden, ist nicht bekannt.

Besonders effektiv wäre für die Schmetterlinge den Ergebnissen der gemachten Versuche mit den Flüssigkeiten nach theoretisch eine Bearbeitung der Pollenkörner mit einer wässrigen Lösung, da diese die Kürbispollenkörner schnell zum Platzen bringt. Dass ein derartiger Effekt eine bedeutende Rolle bei der Pollenbearbeitung spielen könnte, ist aber unwahrscheinlich, da dafür zu viele Pollenkörner in den Präparaten keine entsprechenden Veränderungen aufweisen. Außerdem beobachteten Krenn et al. (2009), dass Präparate von Schmetterlingen, die die Pollenbearbeitung frühzeitig beendeten, nur sehr wenige zerstörte Pollenkörner enthielten. Das Platzen der Pollenkörner in wässriger Umgebung geschieht unter dem Mikroskop jedoch sehr schnell. Um mögliche Effekte des Speichels direkt zu prüfen, könnte man versuchen, von *Heliconius*-Faltern bei der Bearbeitung mit Speichel befeuchtete Pollenpakete unterschiedlicher Pflanzen nach der Benetzung mit der Flüssigkeit unter dem Mikroskop zu untersuchen.

Aus evolutionsbiologischer Sicht hat die nachgewiesene Anwesenheit von Protease im Speichel der pollenfressenden Art *Heliconius melpomene* wahrscheinlich einen Vorteil für die Extraktion von Aminosäuren aus Pollen oder deren Verdauung. Die Frage danach, was die genaue Wirkung der Protease im Speichel der *Heliconius*-Falter ist, also ob sie nötig für die eigentliche Öffnung der Pollenkörner oder „nur“ für die Verdauung des Inhalts nach mechanischer Öffnung ist, bleibt auch nach Durchführung dieser Versuche vorerst weiter offen. Als subjektiv wahrscheinlichere Variante wird an dieser Stelle die mechanische Öffnung vorgeschlagen, wobei die Protease als ein wesentlicher Faktor für die Verdauung des Zellinhaltes angesehen wird. Eine interessante, noch nicht gelöste Fragestellung bezieht sich auf die genaue Zusammensetzung des Speichels und die Art und Konzentration der Protease der *Heliconius*-Falter. Die Wahl der Protease Trypsin für die Versuche liegt in deren relativ großen Verbreitung im Tierreich begründet. Für die Verdauung von Proteinen sind Endopeptidasen und Exopeptidasen nötig (Chapman, 1998). Proteasen vom Trypsintyp gehören neben solchen vom Chymotrypsintyp bei Insekten zu den häufigsten Endopeptidasen des Mitteldarms (Gewecke, 1995; Chapman, 1998). So lässt sich eine höhere Trypsin-Aktivität bei den mehlfressenden Lepidopteren-Gattungen *Ephesia* und *Plodia* und bei Raupen der Lepidopteren-Gattung *Bombyx* nachweisen (Chapman, 1998). Trypsin ist jedoch relativ spezifisch (Chapman, 1998) und schneidet nur Peptidbindungen, deren Carbonylgruppe zu einem Arginin- oder Lysinrest gehört (Penzlin, 2005). Es ist möglich, dass Trypsin auf Pollenproteine keine Wirkung zeigt oder dies durch die Betrachtung unter dem Mikroskop nicht sichtbar wurde.

Ein Ausblick für weitere Forschungen stellt demnach die Klärung der genauen Zusammensetzung des Speichels und die Identifikation der Protease und deren genaue Wirkung auf Pollenkörner dar. Auch eine noch differenziertere Betrachtung von Pollenkörnern nach unterschiedlichen Zeitspannen kurz nach der Benetzung von Pollenpaketen mit dem von den Faltern oral ausgeschiedenen Speichel könnte weiteren Aufschluss über den Pollenbearbeitungsprozess geben. Dies wären interessante zukünftige Forschungsgebiete.

## 5. Zusammenfassung

*Heliconius*-Falter besitzen die Fähigkeit, Pollenkörner durch Ein- und Ausrollbewegungen ihrer Saugrüssel unter Zugabe einer klaren Flüssigkeit aus der Proboscisspitze zu bearbeiten und auf diese Weise Aminosäuren und Stickstoff aus den Pollenkörnern zu gewinnen. Daraus resultieren einige Vorteile für die Falter. Viele Details über den genauen Ablauf der Pollenbearbeitung sind noch nicht geklärt. Eberhard et al. (2009 a) zeigten, dass es sich bei dieser bei der Pollenbearbeitung abgegebenen Flüssigkeit um Speichel und nicht, wie lange angenommen, um hervorgewürgten Nektar handelt. Außerdem gelang Eberhard et al. (2007) der Nachweis einer Protease im Speichel. Krenn et al. (2009) führten Versuche durch, in denen festgestellt wurde, dass das Pollenbearbeitungsverhalten die Pollenkörner teilweise zerstört und schlagen als Ursache der Veränderungen die gefundene Protease vor. Für diese Diplomarbeit erfolgte die Durchführung von Versuchen, um unter standardisierten Bedingungen den Einfluss verschiedener Probeflüssigkeiten (1. Wasser, 2. 25-prozentiger *Lantana*-Nektar (nach Alm et al., 1990) mit Aminosäuren, 3. wässrige Protease-Lösung mit 13 mg Trypsin in 250 ml Wasser, 4. Nektar-Protease-Lösung mit 15,6 mg Trypsin in 100 ml Nektar, 5. Glycerin als Kontrolle) auf den Pollenzustand von frischen Kürbispollenkörnern der Art *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) zu untersuchen. Die Kürbispollenkörner wurden wegen ihrer Verwandtschaft zu den natürlichen Pollenquellen *Gurania* sp. und *Psiguria* sp. (Cucurbitaceae) der pollenfressenden Heliconiinae ausgewählt. Die Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Weise die Zugabe von Nektar, Wasser und Protease-Lösung über eine Zeitspanne von 200 Minuten die Pollenproben beeinträchtigt und die Annahme überprüft werden, dass Nektar oder Wasser alleine zu keinen ähnlichen Veränderungen von Pollenkörnern wie beim Bearbeitungsverhalten führen. Dazu wurden nach 200 Minuten Präparate aus den in die Flüssigkeiten eingelegten Kürbispollenkörnern hergestellt und jeweils 200 Kürbispollenkörner unter dem Mikroskop nach zuvor festgelegten Kriterien als intakt oder verändert klassifiziert. Weiters wurden Individuen von *Heliconius melpomene* Kürbispollenpakete auf den Saugrüssel aufgetragen und für 200 Minuten zur Bearbeitung überlassen. Mit den Pollenpaketen wurden Glycerinpräparate hergestellt und alle Kürbispollenkörner im Präparat nach denselben Kriterien wie bei den Versuchen mit den Flüssigkeiten unter dem Mikroskop klassifiziert. Die Daten wurden mit SPSS 11.5, Excel und R. 2.7.0 ausgewertet und grafisch dargestellt. Der Medianwert lag bei den Versuchen mit den Faltern bei 77,9 % veränderten Pollenkörnern bei 24 Präparaten. Bei den 6 Versuchsbedingungen mit den Flüssigmedien gab es jeweils 15 Durchgänge. Nach 200

Minuten in Glycerin (Gruppe „Glycerin oben“) lag der Medianwert bei 6,0 % veränderten Kürbispollenkörnern und in der zweiten Glyceringruppe (Gruppe „Glycerin“) bei 4,5 %. Nach dem Einlegen in 25-prozentigen *Lantana*-Nektar mit Aminosäuren lag der Medianwert an veränderten Pollenkörnern bei 6,0 %. Bei der Versuchsbedingung „Wasser“ zeigte sich ein Medianwert von 98,5 % an veränderten Pollenkörnern. Nach 200 Minuten in Nektar-Protease-Lösung ergab sich ein Medianwert von 8,0 % veränderten Pollenkörnern und nach 200 Minuten in wässriger Protease-Lösung lag der Medianwert an veränderten Pollenkörnern bei 97,5 %. Nach 200 Minuten zeigen die Ergebnisse der Nektar-Protease-Lösung keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe mit *Lantana*-Nektar ( $p = 1,000$ ) und den Glycerinkontrollgruppen „Glycerin oben“ ( $p = 0,997$ ) und „Glycerin“ ( $p = 0,981$ ) nach den festgelegten Kriterien. Es gibt auch keinen signifikanten Unterschied zwischen der wässrigen Protease-Lösung und Wasser ( $p = 1,000$ ). Die Pollenkörner zeigten in Wasser ebenso wie in der wässrigen Protease-Lösung eine sofortige Reaktion und platzten. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen der wässrigen Protease-Lösung und der Nektar-Protease-Lösung ( $p < 0,001$ ). Die zugesetzte Protease Trypsin kann also nicht als Erklärung für die hohe Zerstörungsrate der Kürbispollenkörner bei der Gruppe mit wässriger Protease-Lösung herangezogen werden. Die Protease in der Nektarflüssigkeit scheint in diesen Versuchen nach den festgelegten Kriterien keinen optisch erkennbaren Effekt auf die Kürbispollenkörner zu haben. Die von *Heliconius melpomene* für 200 Minuten bearbeiteten Pollenkörner weisen einen hohen Grad an Veränderung auf und zeigen stärkere Deformationen als die Pollenkörner nach 200 Minuten in den Flüssigkeiten. Eine mechanische Deformation durch die Pollenbearbeitung wird als Ursache vorgeschlagen. Ob und welche Rolle die von Eberhard et al. (2007) nachgewiesene Protease im Speichel hierbei spielt, muss auch nach den für diese Diplomarbeit durchgeführten Experimenten noch genauer untersucht werden.

## **6. Abstract**

Butterflies of the Neotropical genus *Heliconius* are unusual in that they are able to obtain nutrients, such as amino acids and nitrogen, from floral pollen. Pollen, which they collect on the outside of the proboscis, is processed with a special form of behavior that involves coiling and uncoiling movements of the proboscis. During these movements, the butterflies exude from the tip of the proboscis small amounts of a clear liquid, which mixes with the collected pollen. The ability to utilize pollen as a valuable source of nutrient has resulted in several important advantages for the butterflies. Despite numerous studies on pollen feeding Heliconiinae, detailed research on how the pollen is processed and what happens to the pollen grains are lacking. Eberhard et al. (2009 a) demonstrated that the clear liquid used during processing is actually saliva and not regurgitated nectar [as previously presumed]. Eberhard et al. (2007) furnished evidence that the saliva contains a protease. Krenn et al. (2009) investigated the alteration of pollen grains by butterflies and concluded that the pollen grains were partially physically broken. They ascribed this effect to the enzymatic action of protease. Within the framework of a Diploma thesis, I conducted standardized experiments to study the effect of five different kinds of fluids on the condition of fresh pollen grains of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). The fluids tested were 1) pure water, 2) a 25 % *Lantana*-nectar solution (Alm et al., 1990) to which amino acids were added, 3) a water-protease solution with 13 mg trypsin in 250 ml water, 4) a nectar-protease solution with 15.6 mg trypsin in 100 ml nectar, and 5) glycerin as a control. Pollen grains of *Cucurbita pepo* were chosen for the experiments because they are closely related to the preferred pollen sources *Gurania* sp. and *Psiguria* sp. (both Cucurbitaceae) of these butterflies in their natural habitats. The experiments were designed to provide information on how pollen grains might become altered through the addition of nectar, water or the solutions containing protease. The working hypothesis, which was being tested, was that water and nectar alone should not affect pollen grains in the same manner, as butterflies are able to achieve with their pollen processing behavior. Therefore, pollen was placed into the various fluids for a period of 200 minutes. Microscopic preparations were made of these samples and examined under a microscope. 200 pollen grains per slide were counted and classified as intact or damaged using standardized criteria. In addition, clumps of pollen were placed on the external surface of proboscides of individuals of *Heliconius melpomene*. The butterflies were allowed to process the clumps of pollen for 200 minutes, after which microscopic preparations were prepared from the pollen. All pollen grains that could be found on the slides were counted and classified as intact or damaged. For

statistical evaluation and graphic representation, I used the software programs SPSS 11.5, Excel and R 2.7.0.

Regarding the results of the experiments, the median amount of damaged pollen grains after 200 minutes of pollen processing by the group of *Heliconius* butterflies was 77.9 % from a total of 24 preparations. For each kind of liquid tested, 15 trials were conducted. The median amount of damaged pollen grains after 200 minutes in the first glycerin group with the notation “glycerin oben” was 6.0 % and in the second glycerin group with the notation “glycerin” 4.5 %. The median amount of damaged pollen grains in the group with *Lantana*-nectar was 6.0 % after 200 minutes of incubation. The median amount of damaged pollen grains after 200 minutes of incubation in water was 98.5 %, in the protease-water solution 97.5 % and in the protease-nectar solution 8.0 %. After 200 minutes of incubation, no significant differences resulted between the nectar-protease solution and the group with 25 % *Lantana*-nectar ( $p = 1.000$ ) and between the nectar-protease solution and the control group “glycerin oben” ( $p = 0.997$ ) and “glycerin” ( $p = 0.981$ ). No significant difference was detected between the water-protease solution and the group with pure water ( $p = 1.000$ ). A significant difference exists between the water-protease solution and the nectar-protease solution ( $p < 0.001$ ). Immediately after adding pollen to either to pure water or to the water-protease solution, a very high percentage of the pollen grains burst. Clearly, the added protease cannot be the cause of this alteration. The protease-nectar solution did not visibly appear to have a great effect on the pollen grains according to the predefined criteria. A high percentage of the pollen grains, which were processed by the butterflies for 200 minutes, were damaged and showed a higher degree of deformation than the pollen samples that were incubated in the tested fluids for the same length of time. According to the results of the tests, it is conceivable that the butterflies obtain the nutrients from pollen by mechanically damaging the pollen grains and pressing out the content. The role of protease in the saliva as found by Eberhard et al. (2007) should undergo closer investigation.



## **7. Literaturverzeichnis**

- Alm, J., Ohnmeiss, T.E., Lanza, J., Vriesenga, L. (1990) Preference of cabbage white butterflies and honey bees for nectar that contains amino acids. *Oecologia* 84: 53-57.
- Boggs, C. L., Smiley, J. T., Gilbert, L. E. (1981) Patterns of Pollen Exploitation by *Heliconius* Butterflies. *Oecologia* (Berlin) 48: 284-289.
- Brown K. S., Jr. (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 427-456.
- Chapman, R. (1998) *The Insects: Structure und Function*. 4 th edition. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
- Eberhard, S. H., Krenn, H. W. (2003) Salivary glands and salivary pumps in adult Nymphalidae (Lepidoptera). *Zoomorphology* 122: 161-167.
- Eberhard, S. H., Hrassnigg, N., Crailsheim, K., Krenn, H.W. (2007) Evidence of protease in the saliva of the butterfly *Heliconius melpomene* (L.) (Nymphalidae, Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology* 53: 126-131.
- Eberhard, S. H., Híkl, A. L., Boggs, C. L., Krenn, H. W. (2009 a) Saliva or Regurgitated Nectar? What *Heliconius* Butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) Use for Pollen Feeding. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102(6): 1105-1108.
- Eberhard, S. H., Nemeschkal, H. L., Krenn, H. W. (2009 b) Biometrical evidence for adaptations of the salivary glands to pollen feeding in *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 97: 604–612.
- Estrada, C., Jiggins, C. D. (2002) Patterns of pollen feeding and habitat preference among *Heliconius* species. *Ecological Entomology* 27: 448-456.
- Gewecke, M. (Hrsg.) (1995) *Physiologie der Insekten*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart. Jena. New York.
- Gilbert, L. E. (1972) Pollen Feeding and Reproductive Biology of *Heliconius* Butterflies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 69, No. 6: 1403-1407.
- Gilbert, L. E. (1991) Biodiversity of a Central American *Heliconius* Community: Pattern, Process, and Problems. In: Price, P.W., Lewinsohn, T.M., Fernandes, G. W., Benson, W.W. (Eds.): *Plant-Animal Interactions/ Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley and Sons, New York/ Chichester/ Brisbane/ Toronto/ Singapore. 403-427.
- Hesse M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S. (2009) *Pollen Terminology/ An illustrated handbook*, Springer- Verlag Wien. New York.
- Johnson, S. A., Nicolson, S. W. (2001) Pollen digestion by flower-feeding Scarabaeidae: protea beetles (Cetoniini) and monkey beetles (Hopliini). *Journal of Insect Physiology* 47: 725-733.

Knopp, M.C.N., Krenn, H.W. (2003) Efficiency of Fruit Juice Feeding in *Morpho peleides* (Nymphalidae, Lepidoptera). Journal of Insect Behavior Vol. 16, No 1: 67-77.

Krenn, H. W., Penz, C. M. (1998) Mouthparts Of *Heliconius* Butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): A Search For Anatomical Adaptations To Pollen-Feeding Behaviour. Int. J. Insect Morphol. & Embryol. Vol. 27, No 4: 301-309.

Krenn, H. W. (2008) Feeding behaviours of neotropical butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea). In: Weissenhofer, A., Huber, W., Mayer, V., Pamperl, S., Weber, A., Aubrecht, G. (eds), Natural and Cultural History of the Golfo Dulce Region, Costa Rica. Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz, Austria, Stapfia 88: 295-304.

Krenn, H. W., Eberhard, M. J. B., Eberhard, S. H., Hikl, A., Huber, W., Gilbert, L. E. (2009) Mechanical damage to pollen aids nutrient acquisition in *Heliconius* butterflies (Nymphalidae). Arthropod-Plant Interact. (doi: 10.1007/s11829-009-9074-7).

Murawski, D. A. (1993) Passion Vine Butterflies/ A Taste for Poison. National Geographic 184/ 6: 123-140.

Nepi, M., Franchi, G. G., Pacini, E. (2001) Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. Protoplasma 216: 171-180.

O'Brien, D. M., Boggs, C. L., Fogel, M. L. (2003) Pollen feeding in the butterfly *Heliconius charitonia*: isotopic evidence for essential amino acid transfer from pollen to eggs. Proc. R. Soc. Lond. B 270: 2631-2636.

Penz, C. M., Krenn, H. W. (2000) Behavioral Adaptations to Pollen-Feeding in *Heliconius* Butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae): An Experiment Using *Lantana* Flowers. Journal of Insect Behavior Vol. 13, No. 6: 865-880.

Penzlin, H. (2005) Lehrbuch der Tierphysiologie. 7. Aufl., Elsevier GmbH, München.

Roulston, T. H., Cane, J. H., Buchmann, S. L. (2000) What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? Ecological Monographs, 70 (4): 617-643.

Roulston, T. H., Cane, J. H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. Plant Syst. and Evol. 222: 187-209.

Roulston, T. H., Cane, J. H. (2002) The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). Evolutionary Ecology 16: 49-65.

Soyelu, O. L., Akingbohunbe, A. E., Okonji, R. E. (2007) Salivary glands and their digestive enzymes in pod-sucking bugs (Hemiptera: Coreoidea) associated with cowpea *Vigna unguiculata* ssp. *Unguiculata* in Nigeria. International Journal of Tropical Insect Science. Vol 27. No. 1: 40-47.

Stanley, R.G. Linsens. H.F. (1985) Pollen/ Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verwendung. Urs Freund Verlag GmbH. Greifenberg/Ammersee.

Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, J.W., Bresinsky, A., Körner, C., (2002) Strasburger-Lehrbuch der Botanik. 35. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg- Berlin.

#### Onlinequellen:

A pollen monitor. Das Biotechnologie und Life Sciences Portal Baden-Württemberg. Online unter der URL: [http://www.cluster-biopolymere.de/magazin/wissenschaft/archiv\\_2008/index.html?lang=en&artikelid=%2Fartike1%2F01445%2Findex.html&linkGlossaryTerms=1](http://www.cluster-biopolymere.de/magazin/wissenschaft/archiv_2008/index.html?lang=en&artikelid=%2Fartike1%2F01445%2Findex.html&linkGlossaryTerms=1) [Zugriffsdatum 23.03.2010].

#### Abbildungsverzeichnis:

Abbildungen 2-4 von *Cucurbita pepo* sind Eigentum des Vereins zur Förderung der palynologischen Forschung in Österreich. BUCHNER R. and WEBER M. (2000 onwards). PalDat - a palynological database: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Online unter der URL: <http://www.palдат.org/> [Zugriffsdatum: 08.05.10].

*„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“*

## **8. Anhang**

Im Anhang sind die Ergebnisse der statistischen Analysen angegeben. Die hier angeführten Berechnungen wurden mit dem Computerprogrammen Excel und SPSS 11.5 erstellt.

1. Übersicht über die Ergebnisse der sieben Versuchsbedingungen (Tab. A1-A7) mit Excel
2. Explorative Datenanalyse mit SPSS 11.5
3. Analytische Datenanalyse mit SPSS 11.5

Gruppe 1...*Heliconius melpomene*

Gruppe 2...Glycerin oben

Gruppe 3...Glycerin

Gruppe 4...Wasser

Gruppe 5...Nektar + AS

Gruppe 6...Protease + Wasser

Gruppe 7...Nektar + Protease

## 1. Übersicht über die Ergebnisse der einzelnen Versuchsbedingungen mit Excel

Tab. A1: Erhobene Daten aus Versuchsbedingung 1: In der Tabelle angeführt sind die bei der Pollenbearbeitung durch *Heliconius*-Falter nach den festgelegten Kriterien veränderten Kürbispollenkörner in Relation zur Gesamtzahl der ausgewerteten Kürbispollenkörner in den jeweiligen Präparaten. Weiters ist die Bezeichnung des Präparates angegeben und in der rechten Spalte die Prozentzahl an veränderten Pollenkörnern und die Ergebnisse der Berechnungen mit Excel gerundet auf die zweite Nachkommastelle. Die Bearbeitungszeit war 200 Minuten. Jedes Präparat enthält nur jene Pollenkörner, die von einem Individuum bei einem Durchgang bearbeitet wurden.

<i>Heliconius melpomene</i>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
152	166	3 H25	91,57
10	132	3H28	7,58
23	185	3H26	12,43
207	264	4H29	78,41
169	378	4H32	44,71
33	229	5HA	14,41
90	109	5H25	82,57
201	255	5H28	78,82
34	78	7H29	43,59
68	79	7H25	86,08
69	145	7HC	47,59
191	331	9H28	57,70
77	85	9H25	90,59
6	54	12HI	11,11
100	104	12H28	96,15
62	93	12HH	66,67
41	53	14H29	77,36
374	509	14H28	73,48
410	436	14HD	94,04
375	398	16HD	94,22
289	306	16H29	94,44
33	59	19HG	55,93
367	414	19H25	88,65
167	171	19HE	97,66
	<b>Summe</b>		<b>1585,75</b>
	<b>Mittelwert</b>		<b>66,07</b>
	<b>Median</b>		<b>77,88</b>
	<b>Quantil 75%</b>		<b>90,83</b>
	<b>Maximum</b>		<b>97,66</b>
	<b>Minimum</b>		<b>7,58</b>
	<b>Quantil 25%</b>		<b>46,87</b>
	<b>Varianz</b>		<b>899,02</b>
	<b>Standardabweichung</b>		<b>29,98</b>
	<b>Anzahl Durchgänge</b>		<b>24,00</b>

Tab. A2: Versuchsbedingung 2: Daten nach 200 Minuten in Glycerin (Gruppe „Glycerin oben“). Es wurden pro Präparat 200 Kürbispollenkörner ausgewertet.

<b>Glycerin oben</b>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
5	200	3KG oben	2,50
10	200	4KG oben	5,00
7	200	5KG oben	3,50
12	200	6KG oben	6,00
16	200	7KG oben	8,00
20	200	8KG oben	10,00
11	200	9 KG oben	5,50
17	200	10 KG oben	8,50
9	200	12KG oben	4,50
14	200	13KG oben	7,00
7	200	14KG oben	3,50
13	200	15 KG oben	6,50
9	200	16KG oben	4,50
12	200	19 KG oben	6,00
21	200	20KG oben	10,50
	<b>Summe</b>		<b>91,50</b>
	<b><u>Mittelwert</u></b>		<b><u>6,10</u></b>
	<b><u>Median</u></b>		<b><u>6,00</u></b>
	<b><u>Quantil 75%</u></b>		<b><u>7,50</u></b>
	<b><u>Maximum</u></b>		<b><u>10,50</u></b>
	<b><u>Minimum</u></b>		<b><u>2,50</u></b>
	<b><u>Quantil 25%</u></b>		<b><u>4,50</u></b>
	<b><u>Varianz</u></b>		<b><u>5,58</u></b>
	<b><u>Standardabweichung</u></b>		<b><u>2,36</u></b>
	<b><u>Anzahl Durchgänge</u></b>		<b><u>15,00</u></b>

Tab. A3: Versuchsbedingung 3: Daten nach 200 Minuten in Glycerin (Gruppe „Glycerin“). Es wurden pro Präparat 200 Kürbispollenkörner ausgewertet.

<b>Glycerin</b>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
3	200	3 KG	1,50
4	200	4KG	2,00
9	200	5KG	4,50
10	200	6KG	5,00
8	200	7KG	4,00
8	200	8KG	4,00
14	200	9KG	7,00
4	200	10KG	2,00
9	200	12KG	4,50
13	200	13KG	6,50
5	200	14KG	2,50
23	200	15KG	11,50
11	200	16KG	5,50
12	200	19KG	6,00
14	200	20KG	7,00
	<b>Summe</b>		<b>73,50</b>
	<b><u>Mittelwert</u></b>		<b><u>4,90</u></b>
	<b><u>Median</u></b>		<b><u>4,50</u></b>
	<b><u>Quantil 75%</u></b>		<b><u>6,25</u></b>
	<b><u>Maximum</u></b>		<b><u>11,50</u></b>
	<b><u>Minimum</u></b>		<b><u>1,50</u></b>
	<b><u>Quantil 25%</u></b>		<b><u>3,25</u></b>
	<b><u>Varianz</u></b>		<b><u>6,61</u></b>
	<b><u>Standardabweichung</u></b>		<b><u>2,57</u></b>
	<b><u>Anzahl Durchgänge</u></b>		<b><u>15,00</u></b>

Tab. A4: Versuchsbedingung 4: Daten nach 200 Minuten in 25-prozentigem *Lantana*-Nektar mit Aminosäuren.  
Es wurden pro Präparat 200 Kürbispollenkörner ausgewertet.

<b>Nektar + AS</b>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
14	200	3KN	7,00
11	200	4KN	5,50
7	200	5KN	3,50
12	200	6KN	6,00
17	200	7KN	8,50
10	200	8KN	5,00
15	200	9KN	7,50
11	200	10KN	5,50
12	200	12KN	6,00
9	200	13KN	4,50
16	200	14KN	8,00
23	200	15KN	11,50
36	200	16KN	18,00
12	200	19KN	6,00
15	200	20KN	7,50
	<b>Summe</b>		<b>110,00</b>
	<b><u>Mittelwert</u></b>		<b><u>7,33</u></b>
	<b><u>Median</u></b>		<b><u>6,00</u></b>
	<b><u>Quantil 75%</u></b>		<b><u>7,75</u></b>
	<b><u>Maximum</u></b>		<b><u>18,00</u></b>
	<b><u>Minimum</u></b>		<b><u>3,50</u></b>
	<b><u>Quantil 25%</u></b>		<b><u>5,50</u></b>
	<b><u>Varianz</u></b>		<b><u>12,38</u></b>
	<b><u>Standardabweichung</u></b>		<b><u>3,52</u></b>
	<b><u>Anzahl Durchgänge</u></b>		<b><u>15,00</u></b>



Tab. A5: Versuchsbedingung 5: Daten nach 200 Minuten in Wasser. Es wurden pro Präparat 200 Kürbispollenkörner ausgewertet.

<b>Wasser</b>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
194	200	3KW	97,00
197	200	4KW	98,50
198	200	5KW	99,00
196	200	6KW	98,00
190	200	7KW	95,00
199	200	8KW	99,50
185	200	9KW	92,50
178	200	10KW	89,00
199	200	12KW	99,50
200	200	13KW	100,00
199	200	14KW	99,50
197	200	15KW	98,50
195	200	16KW	97,50
198	200	19KW	99,00
196	200	20KW	98,00
	<b>Summe</b>		<b>1460,50</b>
	<b><u>Mittelwert</u></b>		<b><u>97,37</u></b>
	<b><u>Median</u></b>		<b><u>98,50</u></b>
	<b><u>Quantil 75%</u></b>		<b><u>99,25</u></b>
	<b><u>Maximum</u></b>		<b><u>100,00</u></b>
	<b><u>Minimum</u></b>		<b><u>89,00</u></b>
	<b><u>Quantil 25%</u></b>		<b><u>97,25</u></b>
	<b><u>Varianz</u></b>		<b><u>9,20</u></b>
	<b><u>Standardabweichung</u></b>		<b><u>3,03</u></b>
	<b><u>Anzahl Durchgänge</u></b>		<b><u>15,00</u></b>

Tab. A6: Versuchsbedingung 6: Daten nach 200 Minuten in wässriger Protease-Lösung (13 mg Trypsin in 250 ml Wasser). Es wurden pro Präparat 200 Kürbispollenkörner ausgewertet.

<b>Protease + Wasser</b>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
196	200	3KP	98,00
187	200	4KP	93,50
190	200	5KP	95,00
191	200	6KP	95,50
195	200	7KP	97,50
195	200	8KP	97,50
194	200	9KP	97,00
198	200	10KP	99,00
193	200	12KP	96,50
198	200	13KP	99,00
191	200	14KP	95,50
196	200	15KP	98,00
193	200	16KP	96,50
200	200	19KP	100,00
197	200	20KP	98,50
	<b>Summe</b>		<b>1457,00</b>
	<b><u>Mittelwert</u></b>		<b><u>97,13</u></b>
	<b><u>Median</u></b>		<b><u>97,50</u></b>
	<b><u>Quantil 75%</u></b>		<b><u>98,25</u></b>
	<b><u>Maximum</u></b>		<b><u>100,00</u></b>
	<b><u>Minimum</u></b>		<b><u>93,50</u></b>
	<b><u>Quantil 25%</u></b>		<b><u>96,00</u></b>
	<b><u>Varianz</u></b>		<b><u>3,05</u></b>
	<b><u>Standardabweichung</u></b>		<b><u>1,75</u></b>
	<b><u>Anzahl Durchgänge</u></b>		<b><u>15,00</u></b>

Tab. A7: Versuchsbedingung 7: Daten nach 200 Minuten in Nektar-Protease-Lösung (15,6 mg Trypsin in 100 ml Nektar). Es wurden pro Präparat 200 Kürbispollenkörner ausgewertet.

<b>Nektar + Protease</b>			
Veränderte Pollenkörner im Präparat	Gesamtzahl der Pollenkörner im Präparat	Bezeichnung des Präparates	Prozentsatz an veränderten Pollenkörnern im Präparat
18	200	3KPN	9,00
12	200	4KPN	6,00
29	200	5KPN	14,50
13	200	6KPN	6,50
9	200	7KPN	4,50
33	200	8KPN	16,50
25	200	9KPN	12,50
23	200	10KPN	11,50
16	200	12KPN	8,00
11	200	13KPN	5,50
17	200	14KPN	8,50
16	200	15KPN	8,00
31	200	16KPN	15,50
14	200	19KPN	7,00
9	200	20KPN	4,50
	<b>Summe</b>		<b>138,00</b>
	<b><u>Mittelwert</u></b>		<b><u>9,20</u></b>
	<b><u>Median</u></b>		<b><u>8,00</u></b>
	<b><u>Quantil 75%</u></b>		<b><u>12,00</u></b>
	<b><u>Maximum</u></b>		<b><u>16,50</u></b>
	<b><u>Minimum</u></b>		<b><u>4,50</u></b>
	<b><u>Quantil 25%</u></b>		<b><u>6,25</u></b>
	<b><u>Varianz</u></b>		<b><u>15,78</u></b>
	<b><u>Standardabweichung</u></b>		<b><u>3,97</u></b>
	<b><u>Anzahl Durchgänge</u></b>		<b><u>15,00</u></b>

## 2. Explorative Datenanalyse mit SPSS 11.5

### Verarbeitete Fälle

	GRUPPE	Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Prozent	1	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%
ver-	2	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
änderte	3	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
Pollenkö	4	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
rner	5	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	6	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	7	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%

### Univariate Statistiken

	GRUPPE		Statistik	Standardfehler
Prozent veränderte Pollenkörner	1 <i>H. melpomene</i>	Mittelwert	66,0729	6,12040
		95% Untergrenze	53,4119	
		Konfidenzintervall des Mittelwerts	78,7339	
		5% getrimmtes Mittel	67,5491	
		Median	77,8838	
		Varianz	899,023	
		Standardabweichung	29,98370	
		Minimum	7,58	
		Maximum	97,66	
		Spannweite	90,09	
	2 Glycerin oben	Interquartilbereich	45,8935	,60984
		Schiefe	-,881	
		Kurtosis	-,509	
		Mittelwert	6,1000	
		95% Untergrenze	4,7920	
		Konfidenzintervall des Mittelwerts	7,4080	
		5% getrimmtes Mittel	6,0556	
		Median	6,0000	
		Varianz	5,579	
		Standardabweichung	2,36190	
	3 Glycerin	Minimum	2,50	,580
		Maximum	10,50	
		Spannweite	8,00	
		Interquartilbereich	3,5000	
		Schiefe	,466	
		Kurtosis	-,496	
		Mittelwert	4,9000	
		95% Untergrenze	3,4758	
		Konfidenzintervall des Mittelwerts	6,3242	
		Obergrenze		

4 Wasser	5% getrimmtes Mittel		4,7222	
	Median		4,5000	
	Varianz		6,614	
	Standardabweichung		2,57183	
	Minimum		1,50	
	Maximum		11,50	
	Spannweite		10,00	
	Interquartilbereich		4,0000	
	Schiefe		1,009	,580
	Kurtosis		1,893	1,121
	Mittelwert		97,3667	,78295
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	95,6874	
		Obergrenze	99,0459	
5 Nektar+ AS	5% getrimmtes Mittel		97,6852	
	Median		98,5000	
	Varianz		9,195	
	Standardabweichung		3,03237	
	Minimum		89,00	
	Maximum		100,00	
	Spannweite		11,00	
	Interquartilbereich		2,5000	
	Schiefe		-1,935	,580
	Kurtosis		3,536	1,121
	Mittelwert		7,3333	,90851
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	5,3848	
		Obergrenze	9,2819	
6 Protease + Wasser	5% getrimmtes Mittel		6,9537	
	Median		6,0000	
	Varianz		12,381	
	Standardabweichung		3,51866	
	Minimum		3,50	
	Maximum		18,00	
	Spannweite		14,50	
	Interquartilbereich		2,5000	
	Schiefe		2,226	,580
	Kurtosis		5,974	1,121
	Mittelwert		97,1333	,45110
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	96,1658	
		Obergrenze	98,1008	
	5% getrimmtes Mittel		97,1759	
	Median		97,5000	
	Varianz		3,052	
	Standardabweichung		1,74711	
	Minimum		93,50	
	Maximum		100,00	
	Spannweite		6,50	
	Interquartilbereich		3,0000	
	Schiefe		-,408	,580
	Kurtosis		-,160	1,121

7 Nektar + Protease	Mittelwert		9,2000	1,02562
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	7,0003	
		Obergrenze	11,3997	
	5% getrimmtes Mittel		9,0556	
	Median		8,0000	
	Varianz		15,779	
	Standardabweichung		3,97222	
	Minimum		4,50	
	Maximum		16,50	
	Spannweite		12,00	
	Interquartilbereich		6,5000	
	Schiefe		,672	,580
	Kurtosis		-,812	1,121

### 3. Analytische Datenanalyse mit SPSS 11.5

#### ONEWAY ANOVA

Prozent veränderte Pollenkörner

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	179483,676	6	29913,946	149,473	,000
Innerhalb der Gruppen	21413,919	107	200,130		
Gesamt	200897,595	113			

#### Post-Hoc-Tests

##### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Prozent veränderte Pollenkörner

Tukey-HSD

(I) GRUPPE	(J) GRUPPE	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1 <i>H. melpomene</i>	2	59,9729(*)	4,65626	,000	45,9800	73,9658
	3	61,1729(*)	4,65626	,000	47,1800	75,1658
	4	-31,2938(*)	4,65626	,000	-45,2867	-17,3008
	5	58,7396(*)	4,65626	,000	44,7466	72,7325
	6	-31,0604(*)	4,65626	,000	-45,0534	-17,0675
	7	56,8729(*)	4,65626	,000	42,8800	70,8658
2 Glycerin oben	1	-59,9729(*)	4,65626	,000	-73,9658	-45,9800
	3	1,2000	5,16566	1,000	-14,3238	16,7238
	4	-91,2667(*)	5,16566	,000	-106,7904	-75,7429
	5	-1,2333	5,16566	1,000	-16,7571	14,2904
	6	-91,0333(*)	5,16566	,000	-106,5571	-75,5096
	7	-3,1000	5,16566	,997	-18,6238	12,4238
3 Glycerin	1	-61,1729(*)	4,65626	,000	-75,1658	-47,1800
	2	-1,2000	5,16566	1,000	-16,7238	14,3238
	4	-92,4667(*)	5,16566	,000	-107,9904	-76,9429
	5	-2,4333	5,16566	,999	-17,9571	13,0904
	6	-92,2333(*)	5,16566	,000	-107,7571	-76,7096
	7	-4,3000	5,16566	,981	-19,8238	11,2238
4 Wasser	1	31,2938(*)	4,65626	,000	17,3008	45,2867
	2	91,2667(*)	5,16566	,000	75,7429	106,7904
	3	92,4667(*)	5,16566	,000	76,9429	107,9904
	5	90,0333(*)	5,16566	,000	74,5096	105,5571
	6	,2333	5,16566	1,000	-15,2904	15,7571
	7	88,1667(*)	5,16566	,000	72,6429	103,6904
5 Nektar+ AS	1	-58,7396(*)	4,65626	,000	-72,7325	-44,7466
	2	1,2333	5,16566	1,000	-14,2904	16,7571
	3	2,4333	5,16566	,999	-13,0904	17,9571
	4	-90,0333(*)	5,16566	,000	-105,5571	-74,5096
	6	-89,8000(*)	5,16566	,000	-105,3238	-74,2762
	7	-1,8667	5,16566	1,000	-17,3904	13,6571
6 Protease + Wasser	1	31,0604(*)	4,65626	,000	17,0675	45,0534

	2	91,0333(*)	5,16566	,000	75,5096	106,5571
	3	92,2333(*)	5,16566	,000	76,7096	107,7571
	4	-,2333	5,16566	1,000	-15,7571	15,2904
	5	89,8000(*)	5,16566	,000	74,2762	105,3238
	7	87,9333(*)	5,16566	,000	72,4096	103,4571
7 Nektar + Protease	1	-56,8729(*)	4,65626	,000	-70,8658	-42,8800
	2	3,1000	5,16566	,997	-12,4238	18,6238
	3	4,3000	5,16566	,981	-11,2238	19,8238
	4	-88,1667(*)	5,16566	,000	-103,6904	-72,6429
	5	1,8667	5,16566	1,000	-13,6571	17,3904
	6	-87,9333(*)	5,16566	,000	-103,4571	-72,4096

\* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

## Homogene Untergruppen

Prozent veränderte Pollenkörner

Tukey-HSD<sup>a,b</sup>

GRUPPE	N	Untergruppe für Alpha = .05.		
		1	2	3
3	15	4,9000		
2	15	6,1000		
5	15	7,3333		
7	15	9,2000		
1	24		66,0729	
6	15			97,1333
4	15			97,3667
Signifikanz		,978	1,000	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 15,849.

b Die Gruppengrößen sind nicht identisch. Es wird das harmonische Mittel der Gruppengrößen verwendet. Fehlerniveaus des Typs I sind nicht garantiert.



## **9. Danksagung**

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Dr. Harald Krenn für die Vergabe des Diplomarbeitsthemas und die kompetente Betreuung und freundliche Unterstützung im Rahmen dieser Diplomarbeit bedanken. Die Mitglieder des Departments für Evolutionsbiologie und besonders Stefan Eberhard und seiner Frau Monika standen mir mit ihrem Rat bei auftretenden Fragen, bei der Kontaktaufnahme mit dem Biobauern zum Bezug der Kürbisblüten oder bei Fragen zum Umgang mit den Geräten, etwa mit dem Fotomikroskop, hilfreich zur Seite.

Mein Dank gilt auch besonders der Familie Binder aus Untermallebarn in Niederösterreich für ihre freundliche Unterstützung durch die Erteilung der Genehmigung, Kürbisblüten von ihrem Kürbisfeld zu ernten.

Vielen Dank an Daniel und besonders an Wolfgang, der mir mit dem Statistik-Programm R sehr weitergeholfen hat.

Bei meiner Familie möchte ich mich für ihre Unterstützung während meiner Studienzeit bedanken. Meinem Lebensgefährten Nicolas möchte ich zusätzlich dafür danken, dass er Zeit und Geduld für Ausflüge zum Kürbisfeld in Niederösterreich geopfert hat. Weiters hat er mir mit seinen statistischen Kenntnissen und seinen EDV-Kenntnissen sehr weitergeholfen und mich immer unterstützt.

## **10. Lebenslauf**

Name: Doris Katharina Aichinger

geboren am 22.01.1979

Mutter: Ingrid Aichinger geb. Plakolmer

Vater: Alfred Aichinger

1985-1989: Übungsvolksschule der Pädag. Hochschule der Diözese Linz

1989-1993: Übungshauptschule der Pädag. Hochschule der Diözese Linz

1993-1997: BORG Linz

1997-1998: Lehramtsstudium Anglistik und PPP an der Universität Wien

1998: Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Wien

1999-2003: Lehramtsstudium Biologie und Erdwissenschaften

2003: Beginn des Lehramtsstudiums Biologie und Umweltkunde/ PP an der Universität Wien

2008: Beginn der Diplomarbeit am Department für Evolutionsbiologie an der Universität Wien bei Dr. Harald Krenn.

Sprachen: Englisch, Französisch